

**Punaista lihaa ja marjoja sisältävän
ruokavalion vaikutus ulosteen
N-nitrosoyhdisteisiin ja polyfenoleihin
terveillä aikuisilla**

Pro gradu -tutkielma

Kirsikka Aittola

Ravitsemustiede

Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

Helsingin yliopisto

Joulukuu 2016

Ohjaaja: Anne-Maria Pajari,

yliopistonlehtori, dosentti

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare Kirsikka Katriina Aittola			
Työn nimi / Arbets titel Punaista lihaa ja marjoja sisältävän ruokavalion vaikutus ulosteen N-nitrosoyhdisteisiin ja polyfenoleihin terveillä aikuisilla			
Oppiaine /Läroämne Ravitsemustiede			
Työn laji/Arbets art Pro gradu -tutkielma	Aika/Datum Joulukuu 2016	Sivumäärä/ Sidoantal 70 s. + 11 liitettä	
Tiivistelmä/Referat <p>Tausta ja tavoitteet: Punaisen lihan syömisen on todettu lisäävän paksusuolen syöpäriskiä väestötutkimuksissa. Sen suolistolle haitalliset vaikutukset voivat selittyä suolistossa muodostuvilla N-nitrosoyhdisteillä (NOC). NOC:itä muodostuu ruoansulatuskanavassa suhteessa punaisen lihan syöntimäärään, ja yhdisteitä voidaan mitata ulosteesta ATNC:nä (Apparent Total N-Nitroso Compounds). Ulosteen NOC-pitoisuuden on havaittu olevan yhteydessä paksusuolikasvaimiin eläinmalleissa. Ruokavaliolla voi mahdollisesti vaikuttaa NOC:iden sisäsyntyiseen muodostumiseen. Marjat sisältävät runsaasti kuitua ja ovat hyvä polyfenolien lähde. Nämä yhdessä saattavat vähentää NOC:iden muodostusta suolistossa. Marjojen tai niiden sisältämien polyfenolien vaikutusta NOC:iden muodostukseen ei ole tutkittu aiemmin. Tässä tutkimuksessa tutkitaan, vaikuttaako marjojen syönti ulosteen NOC-pitoisuuteen henkilöillä, joiden ruokavalio sisältää päivittäin punaista lihaa, ja onko NOC:illä yhteyttä ravintoaineiden saantiin. Sen lisäksi mitataan ulosteen polyfenolimetaboliitteja.</p> <p>Aineisto ja menetelmät: Tutkimus oli osa Helsingin yliopistossa, Ravitsemustieteen osastolla, toteutettua KarniMari-tutkimusta. Se oli rinnakkaisasetelmalla toteutettu satunnaistettu interventiotutkimus. Tässä tutkimuksessa käsiteltiin tutkimuksen toista tutkimushaaraa (n = 43), johon kuului kaksi eri ruokavalioryhmää (n = 21 ja n = 22 tutkimusryhmissä). Tutkittavien ikä oli 20–67 vuotta. Tutkittavat nauttivat neljän viikon ajan 150 g sianlihatuotteita päivittäin, minkä lisäksi toinen ryhmä nautti myös noin 200 g marjoja päivittäin. Tutkimusmittaukset tehtiin tutkimuksen alussa sekä lopussa. Tutkittavilta kerättiin ulostenäytteet ja he pitivät ruokapäiväkirjaa. NOC mitattiin ulosteesta mittaamalla typpiyhdisteistä vapautuva typpioksiidi NO-analysaattorilla. Polyfenolimetaboliitit mitattiin ulosteesta UHPLC-DAD-FLD-menetelmällä. Tilastoanalyysissä ryhmien välisiä eroja testattiin t-testillä ja ei-parametrisilla testeillä sekä tarkasteltiin muuttujien välisiä korrelaatioita Spearmanin järjestyskorrelaatiolla. Ohjelmana käytettiin IBM SPSS Statistics 22 -tilasto-ohjelmaa.</p> <p>Tulokset: Tutkimusryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja NOC-pitoisuuksissa tutkimuksen lopussa, vaikka pitoisuudet olivat marjoja syöneillä pienempiä. Marjoja syöneet saivat merkitsevästi enemmän kuitua (p = 0,024) ja C-vitamiinia (p < 0,001) ruoasta. Ulostevvedestä mitattiin polyfenoliyhdisteitä, mutta urolitiiniä tai antosyaaneja ei havaittu. Marjoja syöneillä protokatekiini- (p = 0,027) ja p-kumariinihappojen (p = 0,003) pitoisuudet olivat merkitsevästi kontrolliryhmäläisiä suuremmat.</p> <p>Johtopäätökset: Tällä tutkimusasetelmalla marjojen syönnillä ei pystytty vaikuttamaan ulosteen N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuteen, mutta polyfenolimetaboliittien (protokatekiini- ja p-kumariinihappojen) pitoisuudet suurenivat punaista lihaa sisältävällä ruokavaliolla. Marjojen syönti voi lisätä kuidun saantia ravitsemussuosittelun suosittelemalle tasolle. NOC:iden yhteyttä paksusuolen syöpäriskiin tulee tutkia edelleen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord Ravitsemus, punainen liha, marjat, N-nitrosoyhdisteet, polyfenolit			
Säilytyspaikka – Förvaringställe MMTDK, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, Ravitsemustieteen osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter Ohjaaja: Anne-Maria Pajari, yliopistonlehtori, dosentti			

Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Department Department of Food and Environmental Sciences	
Author Kirsikka Katriina Aittola			
Title Fecal concentrations of N-nitroso compounds and polyphenols in healthy adults following a diet containing red meat and berries			
Subject Nutrition			
Level Master's Thesis	Month and year December 2016	Number of pages 70 p. + 11	
Abstract <p>Background and aim of the study: Based on epidemiological studies, high red meat consumption increases the risk of colon cancer. The association linking red meat and colon cancer might be explained by N-nitroso compounds (NOCs). N-nitroso compounds are formed in the digestive tract from red meat in dose-response manner and NOCs can be detected in feces as ATNCs (Apparent Total N-Nitroso Compounds). NOC concentration in feces is associated with colon tumors in animal studies. Diet may have an effect on endogenous NOC formation. Berries contain a lot of fiber and polyphenols. These compounds may decrease NOC formation. The effects of berries and their polyphenols on NOC formation have not been studied before. This study investigates whether eating berries changes endogenous NOC formation in the gut on a diet containing red meat and whether NOC associates with nutrient intakes. Furthermore, metabolites of polyphenols are measured in the feces.</p> <p>Design and methods: The study was a part of KarniMari Study conducted in the University of Helsinki in the Division of Nutrition. KarniMari Study was a randomized parallel two-armed intervention study. In this work only the other arm of the KarniMari Study (n = 43) is reported. Study subjects' age was 20–67 years. In this study, two different diets were studied (n = 21 and n = 22 in groups). Both diets included 150 grams of pork meat products, which were consumed daily for four consecutive weeks. In addition to pork, the other study group consumed also approximately 200 g of berries daily. Subjects kept a 3-day-food record and collected fecal samples at the beginning and the end of the study. NOCs were measured by detecting nitric oxide released from nitrogen compounds using NO-Analyzer. Polyphenols and their metabolites were analyzed with UHPLC-DAD-FLD method. Statistical analysis were conducted with IBM SPSS Statistics 22 program. The difference between the study groups were tested with T-test and Nonparametric Tests and correlations were tested with Spearman Rank Correlation.</p> <p>Results: There was no significant difference between the study groups in NOC concentration at the end of the study, even though the concentration was slightly lower in the berry group. Subjects who consumed berries had a significantly higher dietary intake of fiber (p = 0,024) and vitamin C (p < 0,001). Polyphenols and their metabolites were detected from fecal water and the total concentration was higher in the berry group compared to the control group. No urolithin nor anthocyanins were detected. Protocatechuic (p = 0,027) and p-coumaric acid (p = 0,003) concentrations were higher in the berry group.</p> <p>Conclusion: Eating berries has no effect on fecal concentration of NOCs but it increased polyphenol concentration, especially protocatechuic and p-coumaric acid, in the feces of subjects on the red meat diet in this study design. Adding berries to diet can increase the intake of fiber to the level recommended by the Finnish nutrition recommendations. The association between the fecal NOC and the risk of colon cancer needs more research.</p>			
Keywords Nutrition, red meat, berries, N-nitroso compounds, polyphenols			
Where deposited Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food and Environmental Sciences, Nutrition			
Additional information Supervisor: Dr. Anne-Maria Pajari			

KÄYTETYT SELITTEET JA LYHENTEET

μSPE	mikro-kiinteäfaasiuuttosysteemi, engl. micro Solid-Phase Extraction
AICR	Amerikan syöpätutkimussäätiö, engl. American Institute for Cancer Research
ATNC	N-nitrosoyhdisteet, engl. Apparent Total N-Nitroso Compounds
BMI	painoindeksi, engl. Body Mass Index
DAD-FLD	diodirividetektorii-fluoresenssi-ilmaisim, engl. Diode Array and Fluorescence Detection
HAA	heterosyklinen aromaattinen amiini
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia, engl. High Performance Liquid Chromatography
NDMA	N-nitrosodimetyyliamiini
NEM	N-etyylimaleimidia
NO	typpioksidi
NOC	N-nitrosoyhdisteet, engl. N-Nitroso Compound
PAH	polysyklinen aromaattinen hiilivety
PCA	protokatekiinihappo
Prosessoitu liha	eri tavoin käsitelty (esim. savustus, suolaus, palvaus, lisäaineiden lisäys) liha, joka sisältää lisättyjä ainesosia, kuten lisäaineita ja suolaa
Punainen liha	naudan-, porsaan-, hevosen-, lampaan- ja vuohenliha
SL	säilytysliuos
THL	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos
UHPLC	erittäin korkean suorituskyvyn kromatografi, engl. Ultra High Performance Liquid Chromatography
WCRF	Maailman syöpätutkimussäätiö, engl. World Cancer Research Fund

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	9
2.1 Paksusuolisyöpä	9
2.1.1 Yleisyys	9
2.1.2 Syövän perinnöllisyys ja tyypit	9
2.1.3 Muut riskitekijät	10
2.2 Paksusuolen syöpäriski ja ravitseminen	10
2.2.1 Ravitseminen- ja elintapatekijät	10
2.3 Punaisen ja prosessoidun lihan yhteys paksusuolisyöpään	11
2.3.1 Punaisen ja prosessoidun lihan määritelmä	11
2.3.2 Epidemiologinen näyttö ja punaisen lihan kulutus	12
2.4 Punaisen lihan syönnin mahdolliset vaikutustavat paksusuolisyöpään	13
2.4.1 Punaisen lihan sisältämä rasva, proteiini ja aineenvaihduntatuotteet	13
2.4.2 Lihan prosessoinnissa muodostuvat haitalliset yhdisteet	14
2.4.3 Hemirauta	15
2.5 N-nitrosoyhdisteet	15
2.5.1 N-nitrosoyhdisteiden yhteys paksusuolen syöpään	16
2.5.2 Eläin- ja solututkimukset	16
2.5.3 N-nitrosoyhdisteiden analysointi	17
2.5.4 N-nitrosoyhdisteet ja punainen liha	18
2.5.5 Siipikarjanlihan, kalan ja nitriitin vaikutus NOC-pitoisuuteen	19
2.5.6 Muiden ravintotekijöiden vaikutus N-nitrosoyhdisteisiin	20
2.6 Marjat ja paksusuolisyöpä	20
2.6.1 Kasvisten, hedelmien ja marjojen yhteys paksusuolen syöpäriskiiin	20
2.6.2 Kasvisten, hedelmien ja marjojen saantisuositus ja kulutus Suomessa	21
2.7 Marjojen polyfenolit	21
2.7.1 Marjojen polyfenolipitoisuus	22
2.7.2 Polyfenolien saanti	23
2.7.3 Polyfenolien imeytyminen	24
2.7.4 Marjojen polyfenolimetaboliitit	25
2.8 Marjojen, polyfenolien ja niiden metaboliittien yhteys paksusuolisyöpään	27
2.8.1 Epidemiologiset tutkimukset	27
2.8.2 Solu- ja eläinkokeet	27
2.8.3 Kliiniset tutkimukset	28
2.8.4 Vaikutukset N-nitrosoyhdisteisiin	29

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE	30
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	31
4.1 Tutkimusasetelma ja aineisto	31
4.2 Voimalaskelma	32
4.3 Tutkimusruokavalio	32
4.4 Menetelmät	33
4.4.1 Ruoankäytön mittaaminen	33
4.4.2 Paino, pituus, verenpaine ja verinäyte	33
4.5 Ulostenäytteet	34
4.5.1 Ulostenäytteiden keräys	34
4.5.2 Ulostenäytteiden käsittely	34
4.5.3 Ulostenäytteiden analyysit	35
4.5.4 N-nitrosoyhdisteiden mittaus	35
4.5.5 Käytetyt liuokset	36
4.5.6 Näytteiden valmistelu ja mittaus	36
4.6 Polyfenolien ja niiden metaboliittien analysointi	37
4.7 Aineiston tilastomenetelmät	38
4.8 Eettiset kysymykset ja tietoturva	39
5 TULOKSET	40
5.1. Taustamuuttujat	40
5.1.1 Lähtötilanne	40
5.1.2 Lopputilanne	41
5.2 Ruoankäyttö ja ravintoaineiden saanti	42
5.2.1 Lähtötilanne	42
5.2.2 Lopputilanne	43
5.3 N-nitrosoyhdisteet	44
5.4 Polyfenolit ja niiden metaboliitit	47
6 POHDINTA	50
6.1 NOC, punainen liha ja marjat	50
6.2 Marjat ja polyfenolimetaboliitit	52
6.2.1 Polyfenolimetaboliitit	54
6.3 Suolistomikrobien vaikutus	56
6.4 N-nitrosoyhdisteiden ja marjojen syönnin yhteys paksusuolisyöpään	56

6.5 Tutkimuksen heikkoudet	57
6.6 Tutkimuksen vahvuudet	59
6.7 Käytännön merkitys ja tulevaisuus	59
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	62
KIRJALLISUUSLUETTELO	63
LIITTEET	71
LIITE 1. Ohje tutkimusruokavaliosta ja sen rajoitteista	
LIITE 2. KarniMari-tutkimuksen sianlihatuotteiden ainesosat	
LIITE 3. Ohjeet liha-annosten nauttimista varten	
LIITE 4. Ohjeet marja-annosten nauttimista varten	
LIITE 5. Ohjeet ulostenäytteen ottoa varten (Aloituskäynti)	
LIITE 6. Kuva huuhteluastiasta	
LIITE 7. Polyfenolimetaboliittien korrelaatiotuloksia	
LIITE 8. N-nitrosoyhdisteiden, punaisen lihan ja marjojen välisiä korrelaatiotuloksia	
LIITE 9. Muuttujien välisiä korrelaatiokuvaajia	
LIITE 10. N-nitrosoyhdisteiden ja ravintoaineiden välisiä korrelaatiotuloksia	
LIITE 11. Polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien kuvaajia tutkimusryhmittäin	

1 JOHDANTO

Elimistön solujen elinkaari on tarkoin säädelty. Syöpä saa alkunsa muuntuneesta solusta, jonka kehitys ja jakautuminen on häiriintynyt elimistön puolustusjärjestelmästä huolimatta. Mutaatiot geneeissä lisäävät sairastumisriskiä syöpään, mutta taudin kehittyminen on pitkä tapahtumasarja, johon vaikuttavat niin ympäristötekijät, elintavat kuin elimistön sisäiset tekijät. Yhtä mieltä ollaan siitä, että ruoka ja ravintoaineet sekä ruoanvalmistustavat vaikuttavat riskiin sairastua moniin eri syöpiin. Ruoan ja ravintoaineiden vaikutukset voivat olla sekä suotuisia että epäsuotuisia syövän kehityksen kannalta. Vaikutus voi olla suoraa tai se voi tapahtua esimerkiksi suoliston kautta (WCRF/AICR 2007).

Paksusuolisyöpä on yksi maailman yleisimmistä syöväistä ja erityisen yleinen se on teollistuneissa maissa, kuten Suomessa (WCRF/AICR 2007, Mecklin ym. 2016). Miehillä sitä diagnosoidaan naisia enemmän. Ruoka ja ravintoaineet ovat erittäin tärkeässä roolissa paksusuolen syövän ehkäisyssä sekä sen synnyssä. Maailman syöpätutkimussäätiön WCRF:n (World Cancer Research Fund) ja Amerikan syöpätutkimussäätiön AICR:n (American Institute for Cancer Research) mukaan punaisen ja prosessoidun lihan runsas syönti lisää paksusuolisyöpäriskiä vahvaan tieteelliseen näyttöön perustuen. Syöpätutkimussäätiöt kehottavat maailmanlaajuisesti rajoittamaan punaisen ja prosessoidun lihan syöntiä. Punaisen lihan syömisen vähentäminen on huomioitu yhä vahvemmin myös suomalaisissa ravitsemussuosituksissa (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014).

Punaisen ja prosessoidun lihan mahdollisia vaikutustapoja paksusuolisyöpään on arveltu olevan esimerkiksi sen sisältämä tyydyttynyt rasva, proteiini, lihan valmistuksessa muodostuvat karsinogeenit eli syöpävaaralliset yhdisteet, lihan sisältämä hemirauta, lihan säilöntäaineena käytettävä nitriitti sekä N-nitrosoyhdisteet (WCRF/AICR 2010). Monet N-nitrosoyhdisteistä on luokiteltu karsinogeneiksi. Punaisen lihan sisältämät typpiyhdisteet toimivat lähtöaineina N-nitrosoyhdisteille, joita muodostuu ruoansulatuskanavassa, mikä on todennäköisesti suolistolle haitallista. Tutkimusten mukaan N-nitrosoyhdisteiden muodostumiseen suolistossa voi mahdollisesti vaikuttaa ruokavaliolla.

Ravintokuidun runsas saanti sen sijaan on yhteydessä pienentyneeseen paksusuolen syöpäriskiin (WCRF/AICR 2010). Mahdollisesti myös kasvien, hedelmien ja marjojen syönte on suolistolle hyväksi. Marjat ovat hyvä kuidun lähde ja ne sisältävät runsaasti polyfenoleja. Polyfenolit voivat jossain määrin imeytyä suolistosta, mutta valtaosa niistä kulkeutuu imeytymättöminä paksusuoleen (Manach ym. 2004). Suolistossa polyfenolit muokkautuvat erilaisiksi aineenvaihduntatuotteiksi, jotka saattavat vaikuttaa sekä elimistön että suoliston toimintaan. Polyfenoleilla ja niiden aineenvaihduntatuotteilla on havaittu muun muassa antioksidanttisia vaikutuksia, ja ne voivat sitoutua reaktiivisiin yhdisteisiin muodostaen erilaisia komplekseja ja siten mahdollisesti estää syöpävaarallisten N-nitrosoyhdisteiden muodostumista ruoansulatuskanavassa. Polyfenoleilla on havaittu tutkimuksissa erilaisilla koeasetelmilla paksusuolen syövältä ehkäiseviä vaikutuksia (Núñez-Sánchez ym. 2015).

Tämän tutkimuksen lähtöajatuksena oli, voisiko punaista lihaa käyttäessä ruokavalion muulla sisällöllä, tässä tapauksessa marjoilla, ehkäistä punaisen lihan aiheuttamia haitallisia vaikutuksia suolistolle. Tutkimus on osa KarniMari-interventiotutkimusta, joka toteutettiin vapaaehtoisilla syksyllä 2014 Helsingin yliopistossa, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksessa. Tämän pro gradu -tutkielman päätavoitteena oli tutkia, vaikuttaako marjojen syöminen sianlihaa sisältävällä ruokavaliolla sisäsyntyiseen N-nitrosoyhdisteiden muodostumiseen, ja pienentääkö se N-nitrosoyhdisteiden pitoisuutta ulosteesta mitattuna terveillä koehenkilöillä. Tutkimuksessa ulostenäytteistä mitattiin myös tiettyjen polyfenolien pitoisuuksia. Näiden arvellaan olevan muun muassa marjojen sisältämien polyfenolien aineenvaihduntatuotteita. Sen lisäksi laskettiin tutkimusryhmien ravintoaineiden saanti sekä niiden yhteys N-nitrosoyhdisteiden ja polyfenolien pitoisuuksiin.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Paksusuolisyöpä

2.1.1 Yleisyys

Paksusuolisyöpä on maailmanlaajuisesti yksi yleisimmistä syöivistä; vuonna 2012 se oli miehillä kolmanneksi yleisin ja naisilla toiseksi yleisin syöpätyyppi (IARC 2015). Sen ilmaantuvuus on suurta erityisesti länsimaissa, kuten Australiassa sekä Euroopan ja Pohjois-Amerikan maissa. Suomessa paksusuolisyöpä (peräsuolisyöpä mukaan luettuna) on miehillä kolmanneksi yleisin syöpä, vuonna 2012 tapauksia oli 1540, naisilla puolestaan 1403 (Suomen Syöpärekisteri 2014, Mecklin ym. 2016). Naisilla paksusuolisyöpä on toiseksi yleisin syöpä rintasyövän jälkeen. Miesten osalta paksusuolen ikävakioitu syöpäilmaantuvuus on jopa kaksinkertaistunut viimeisen 50 vuoden aikana. Naisten kohdalla ilmaantuvuuden kasvu ei ole ollut yhtä merkittävää. Suolistosyövän hoitotulokset parantuvat jatkuvasti, mutta edelleen kuolleisuus syöpään on suurta (Mecklin ym. 2016).

2.1.2 Syövän perinnöllisyys ja tyypit

Paksusuolisyöpäriskiinkin vaikuttaa perinnöllisyys: syöpätapauksista noin 7 % johtuu perinnöllisistä sairauksista, minkä lisäksi noin 20 %:lla sairastuneista on taudille perinnöllistä alttiutta (WHO 2015). Perinnöllisiä oireyhtymiä ovat muun muassa familiaalinen adenomatoottinen polypoosi ja ei-polypoottinen paksusuolisyöpäsyndrooma eli Lynchin syndrooma (Järvinen ym. 2013, Mecklin ym. 2016). Paksusuolisyöivistä 95 % on adenokarsinoomia eli rauhasepiteelistä lähtöisin olevia syöpäkasvaimia. Adenoomalla tarkoitetaan limakalvon kohoumaa eli polyyppeä, jolla on tunnusomainen mikroskooppinen rakenne. Suoliston adenoomassa voi esiintyä joko lievää tai vaikeaa dysplasiaa eli epiteelin erilaistumishäiriötä. Vaikealla dysplasialla tarkoitetaan jo syöpämuutosta. Adenooma voi olla hyvälaatuinen, mutta jos sitä ei poisteta, se kasvaa ja syöpään viittaavat piirteet lisääntyvät. Adenooman kehittyminen pahalaatuiseksi voi kestää vuosia, jopa 5–10 vuotta, mutta kaikki adenoomat eivät ehdi kehittyä syöviksi (Järvinen ym. 2013).

2.1.3 Muut riskitekijät

Suoliston tulehdukselliset sairaudet, kuten haavainen paksusuolen tulehdus (Colitis ulcerosa), voivat altistaa paksusuolisyövälle (Mecklin ym. 2016). Viime aikoina krooninen tulehdus on liitetty paksusuolen syöpäriskiin ja sen on havaittu edesauttavan kasvaimien muodostuksen eri vaiheita useiden mekanismien kautta (WCRF/AICR 2007, Demeyer ym. 2016). Perinnöllisyyden lisäksi myös elintavoilla on vaikutus tautiriskiin, sillä arviolta 30–40 % paksusuolen syöpätapauksista olisi ehkäistävissä elintapojen avulla. Yleiset kroonisten tautien riskitekijät, kuten tupakointi, lihavuus, alkoholin kulutus ja vähäinen fyysinen aktiivisuus lisäävät myös paksusuolisyövän riskiä. Myös suoliston bakteeriflooralla voi olla merkitys syöpäriskiin. Suoliston mikrobistoon vaikuttavat eri tekijät, kuten synnytystapa, geneettiset tekijät, elimistön puolustusjärjestelmä, antibioottien käyttö ja ruokavalio (Scott ym. 2013). Terve suoliston bakteeristo suojelee suoliston soluja taudin aiheuttajilta ja vaikuttaa solujen uusiutumiseen, mutta tämän tasapainon määrällinen tai laadullinen muutos voi edesauttaa suolistosyövän kehittymistä (Demeyer ym. 2016).

2.2 Paksusuolen syöpäriski ja ravitseminen

2.2.1 Ravitseminen- ja elintapatekijät

Maailman syöpätutkimussäätiö WCRF yhdessä Amerikan syöpätutkimussäätiön AICR:n kanssa ovat arvioineet vuonna 2010 ruoan, ravitsemuksen ja fyysisen aktiivisuuden yhteyttä paksusuolisyöpäriskiin sen hetkisen tutkimusnäytön perusteella. Kirjallisuuskatsauksen päätulokset ovat taulukossa 1. Sen mukaan eri elintapatekijät voivat pienentää tai suurentaa paksusuolen syöpäriskiä. Katsauksen mukaan tutkimusnäyttö on vahvaa punaisen ja prosessoidun lihan, alkoholin kulutuksen, lihavuuden, keskivartalolihavuuden sekä aikuispituuden paksusuolisyöpäriskiä suurentavasta vaikutuksesta. Fyysinen aktiivisuus ja kuitupitoisen ruoan, kuten esimerkiksi täysjyväviljan ja kasvisten, syöminen sen sijaan pienentää paksusuolen syöpäriskiä. Muiden ravitsemustekijöiden vaikutus suolistosyöpään ei ole katsauksen mukaan tieteellisesti yhtä vahvaa (WCRF/AICR 2010).

Taulukko 1. Paksusuolisyöpään vaikuttavat ravitsemus- ja elintapatekijät WCRF/AICR:n mukaan tutkimusnäyttöön perustuen (mukailtu WCRF/AICR 2011).

Näytön vahvuus	Pientää riskiä	Suurentaa riskiä
Vakuuttava	Kaikki fyysinen aktiivisuus Kuitupitoiset ruoat	Punainen liha Prosessoitu liha Alkoholi (miehet) Lihavuus Keskivartalolihavuus Korkea pituus aikuisena
Todennäköinen	Valkosipuli Maito Kalsium (kalsiumlisä 1200 mg/d)	Alkoholi (naiset)
Rajallinen: viitteellinen	Ei-tärkkelyspitoiset kasvikset Hedelmät ja marjat D-vitamiinipitoiset ruoat	Rautaa sisältävät ruoat (kasvi- ja eläinperäiset) Juusto Eläinrasvaa sisältävät ruoat Lisättyä sokeria sisältävät ruoat
Rajallinen: ei johtopäätöstä	Kala, glykeeminen indeksi, folaatti, C- ja E-vitamiini, seleeni, vähärasvainen ruokavalio	

2.3 Punaisen ja prosessoidun lihan yhteys paksusuolisyöpään

2.3.1 Punaisen ja prosessoidun lihan määritelmä

Punaisella lihalla tutkimuksissa tarkoitetaan usein sellaisten eläinten lihaa, jotka sisältävät enemmän niin kutsuttuja punaisia lihassoluja (runsaasti mitokondrioita ja myoglobiinia) kuin valkoisia (WCRF/AICR 2007, Oostindjer ym. 2014). Siten punaista lihaa on naudan-, sian-, lampaan-, vuohen- ja hevosenliha. Näiden eläinten sisäelimet luokitellaan pääasiassa myös punaiseksi lihaksi. Siipikarjanlihaa kutsutaan vastaavasti valkoiseksi lihaksi erilaisten lihassolujen takia. Villinä elävien riistaeläinten, joista Suomessa yleisiä ovat esimerkiksi hirvi ja jänis, lihaa ei luokitella tällä hetkellä punaiseksi lihaksi vähäisen tutkimustiedon takia. Liha ja punainen liha voivat olla prosessoitua. Suomalaisissa ravitsemussuosituksissa prosessoidusta lihasta käytetään termiä lihavalmiste (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Ei ole olemassa yhtä yleisesti hyväksyttyä määritelmää prosessoidulle lihalle. WCRF/AICR (2007)

tarkoittaa sillä lihaa, joka on jollain tavoin käsitelty säilymisen parantamiseksi esimerkiksi savustamalla, suolaamalla tai lisäämällä siihen säilöntäaineita. Prosessoituja lihavalmisteita ovat esimerkiksi makkarat, leikkeleet, lihapullat ja pekoni. Jauheliha ei normaalisti sisällä säilöntäaineita, joten sitä ei yleensä pidetä prosessoituna lihana. Myöskään kypsennettyä lihaa, jota kylmäsäilytetään, ei yleensä luokitella prosessoituksi lihaksi. Prosessoitu liha voi sisältää myös valkoista lihaa (WCRF/AICR 2007).

2.3.2 Epidemiologinen näyttö ja punaisen lihan kulutus

Etenevistä kohorttitutkimuksista tehtyjen meta-analyysien mukaan punaisen ja prosessoidun lihan kulutus on merkitsevästi yhteydessä suurentuneeseen paksusuolisyöpärisktiin ja usein yhteydelle on havaittu annos-vastesuhde (Alexander ym. 2010, Alexander ym. 2011, Chan ym. 2011). WCRF ja AICR päätyivätkin vuonna 2007 sekä vuonna 2010 päivitetystä katsauksessaan samankaltaiseen tulokseen (WCRF/AICR 2007, WCRF/AICR 2010). Tämän takia ne antoivat vuonna 2007 suosituksen punaisen lihan syönnistä tutkimusnäyttöön perustuen. Sen mukaan punaista lihaa ei tulisi syödä väestötasolla yli 300 g viikossa ja prosessoitua lihaa ei tulisi syödä lähes ollenkaan. Yksilötason suositus lihaa syöville on 500 g kypsennettyä punaista lihaa (mikä vastaa 700–750 g raakaa lihaa) viikossa. Vuonna 2014 julkaistuissa suomalaisissa ravitsemussuosituksissa kehoitetaan entistä enemmän rajoittamaan punaisen ja prosessoidun lihan syömistä ja suositus väestötasolla on enintään 500 g punaista lihaa viikossa (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Punainen liha suositellaan korvattavan esimerkiksi vähärasvaisella siipikarjanlihalla tai kalalla. Finravinto 2012 - tutkimuksen mukaan 25–64-vuotiaat suomalaiset miehet syövät punaista ja prosessoitua lihaa keskimäärin 144 g ja naiset 78 g päivässä (Helldán ym. 2013). Siipikarjanlihaa syödään keskimäärin 39 g (miehet) ja 28 g (naiset), kalaa puolestaan 34 g ja 27 g päivässä. Verrattuna vuoden 2007 Finravinto-tutkimuksen tuloksiin (Paturi ym. 2008), liharuokien syönti kasvoi sekä miehillä että naisilla, erityisesti kana- ja kalkkunaruokien osalta. Suomalaiset miehet syövät punaista lihaa keskimäärin kaksi kertaa enemmän kuin suositellaan (Helldán ym. 2013, Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014).

2.4 Punaisen lihan syönnin mahdolliset vaikutustavat paksusuolisyöpään

Punainen liha on hyvä proteiinin lähde ja se sisältää runsaasti esimerkiksi tyydyttyntä rasvaa, rautaa ja monia B-ryhmän vitamiineja, kuten B₁₂-vitamiinia, jota ei saada kasviperäisistä lähteistä (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Rasvan laatu ja määrä vaihtelevat punaisessa lihassa muun muassa eläimen, lajin, ruokinnan ja ruhon osan mukaan (WCRF/AICR 2007). Punaisen lihan suolistolle haitallisten vaikutusten on arveltu liittyvän muuan muassa lihan sisältämiin, ohutsuolessa imeytymättömiin, proteiineihin, sen sisältämään rasvaan, lihan kypsennyksessä muodostuviin heterosyklisiin aromaattisiin amiineihin (HAA) ja polysyklisiin aromaattisiin hiilivety-yhdisteisiin (PAH), lihan sisältämään hemirautaan sekä reaktiivisiin typpiyhdisteisiin eli N-nitrosoyhdisteisiin (NOC, engl. N-nitroso compounds) (Bastide 2011, Kim ym. 2013, Demeyer 2016). Nämä lihan sisältämät ja lihasta elimistössä syntyvät haitalliset yhdisteet voivat mahdollisesti itsenäisesti tai synergisesti vaurioittaa solujen DNA:ta suolistossa ja siten vaikuttaa paksusuolisyövän syntyyn. Ne saattavat myös vaikuttaa yhdessä esimerkiksi matala-asteiden tulehduksen ja suoliston bakteeriston kanssa (Demeyer ym. 2016).

2.4.1 Punaisen lihan sisältämä rasva, proteiini ja aineenvaihduntatuotteet

Punaisen lihan sisältämää rasvaa, joka on enimmäkseen tyydyttyntä, on esitetty yhdeksi sen haitalliseksi tekijäksi (Kim ym. 2013, Demeyer ym. 2016). Runsas rasvan saanti lisää sekundääristen sappihappojen eritystä sapesta suolistoon, minkä vaikutusta suolistokasvainten muodostukseen on tutkittu. Muut mahdolliset vaikutustavat liittyen rasvaan, on vapaiden rasvahappojen haitallinen vaikutus suoliston epiteeliin. Sen lisäksi runsaasti rasvaa sisältävä ruokavalio on liitetty ylipainoriskiin, mikä puolestaan on paksusuolisyövän riskitekijä. Väestötutkimuksista ei ole kuitenkaan saatu vahvistusta punaisen lihan rasvahypoteesille (Demeyer ym. 2016).

Liha sisältää runsaasti proteiinia. Arviolta noin 12–18 g imeytymätöntä proteiinia kulkeutuu paksusuoleen päivittäin, mikä pitää sisällään sekä ruoasta peräisin olevan proteiinin että ruoansulatuksessa eritetyt entsyymit (Scott ym. 2013). Paksusuoleessa bakteerit muokkaavat imeytymättömiä proteiineja ja hiilihydraatteja. Paksusuolen proksimaalisessa osassa bakteerit metaboloivat ruoan hiilihydraatteja ja pH on siellä happamampi verrattuna paksusuolen distaaliseen osaan. Paksusuolisyöpää havaitaan eniten distaaliosassa suolta, missä muokataan erityisesti imeytymätöntä proteiinia. Paksusuoleen tulevan proteiinin määrä riippuu

syödyn proteiinin laadusta ja määrästä. Sen hajotessa paksusuolella muodostuu tyypeä ja aminohappoja bakteerien energiaksi sekä jatkoreaktioihin. Reaktioissa tapahtuu myös deaminaatiota eli aminoryhmien poistoa, jossa muodostuu lyhyt- ja haaraketjuisia rasvahappoja sekä ammoniakkia (Scott ym. 2013). Ammoniakin tiedetään olevan haitallista suolen epiteelille (Demeyer ym. 2016, Bastide ym. 2011). Haaraketjuiset rasvahapot muodostuvat pääasiassa haaraketjuisista aminohapoista, eli valiinista, isoleusiinista ja leusiinista, ja näiden pitoisuutta ulosteessa voidaan pitää proteiinien hajoamisen markkerina (Scott ym. 2013). Aromaattisten aminohappojen bakteerien deaminaatiossa muodostuu puolestaan fenoli- ja indoleyhdisteitä. Imeytymättömien aminohappojen dekarboksylaatio tuottaa paksusuolella amiineja, jotka voivat toimia nitrosoamiinien, eräiden N-nitrosoyhdisteiden, lähtöaineina (Bastide 2011). Nämä monet proteiinien hajoamisen metaboliatuotteet voivat olla suolen epiteelille haitallisia ja eri mekanismeilla voi olla yhteisvaikutus paksusuolisyövän kehittymiseen.

2.4.2 Lihan prosessoinnissa muodostuvat haitalliset yhdisteet

Punaisen lihan prosessointi, kuten säilöntäaineiden lisääminen, voi muodostaa lihaan karsinogeneja aineiden reagoissa lihan sisältämien yhdisteiden kanssa (WCRF/AICR 2007). Lihan kypsentyminen kovassa kuumuudessa muodostaa lihaan mahdollisia tai todettuja syöpävaarallisia aineita kuten HAA- ja PAH-yhdisteitä. HAA-yhdisteitä muodostuu lihaksen aminohapoista korkeissa kypsennyslämpötiloissa. Erityisesti grillaus avotulella tai hiilillä ja uppopaisto öljyssä saavat aikaan paljon näitä yhdisteitä. Ruoan kypsennys erimerkiksi avotulesa aiheuttaa puolestaan PAH-yhdisteiden muodostusta ruoan pinnassa (WCRF/AICR 2007).

Lihavalmisteet sisältävät usein säilöntäaineita, kuten nitriittiä (Evira 2016). Nitriitti vaikuttaa lihavalmisteiden väriin, säilyvyyteen ja makuun. Lisäaine-nitriitin käyttömäärä elintarvikkeissa on EU:ssa säädelty. Se voi reagoida suolistossa aminohappojen kanssa ja muodostaa N-nitrosoyhdisteitä (Hughes ym. 2001). Nitriittiä pidetään mahdollisena karsinogeenina, sillä se on N-nitrosoyhdisteiden lähtöaine (WCRF/AICR 2007). Väestötutkimusten mukaan tutkimusnäyttö nitriitin yhteydestä paksusuolisyövän riskiin on vielä epäselvä (Xie ym. 2016).

2.4.3 Hemirauta

Lihan sisältämä rauta on hemirautaa, kun taas kasvikunnan tuotteissa rauta on ei-hemirautaa, joka imeytyy ruoansulatuselimistöstä hemirautaa huonommin (Freese ja Voutilainen 2012). Hemirauta on kiinni porfyriinirakenteessa. Rauta osallistuu elimistössä hapetus-pelkistysreaktioihin ja voi siten aiheuttaa oksidatiivisia vaurioita esimerkiksi DNA:han, proteiineihin tai solukalvon lipideihin, minkä takia sen toimintaa elimistössä säädelään tarkkaan. Meta-analyysin mukaan runsas lihaperäisen hemiraudan saanti etenevien kohorttitutkimusten perusteella on merkitsevästi yhteydessä suurentuneeseen paksusuolen syöpäriskiin (Bastide ym. 2011). Punaisen lihan sisältämä hemirauta mahdollisesti katalysoi N-nitrosoyhdisteiden muodostumista ja rasvojen hapettumista ja siten haitallisten vapaiden radikaalien muodostumista suolistossa (Cross ym. 2003, Bastide ym. 2011).

Rotilla tehdyssä tutkimuksessa on havaittu, että paljon hemiä sisältävä ruokavalio vahingoittaa paksusuolen epiteeliä aiheuttaen epiteelin hyperplasiaa eli liikakasvua, mikä voi johtaa lopulta syöpäkasvaimen muodostumiseen (Pierre ym. 2004, Vogel ym. 2008). *In vivo* -tutkimuksessa verrattiin ilmakeivattua kinkun, hemin ja hemoglobiinin vaikutuksia syövän esiasteen biomarkkereihin rotilla (Pierre ym. 2010). Tutkimuksen mukaan ulosteesta eristetyn ulosteveden sytotoksisuus ja lipidien hapettuminen oli suurempaa kinkku- ja hemiruokavaliolla kuin hemoglobiinia sisältävällä ruokavaliolla. Tutkijat spekuloivat, että ruoan vapaa hemi olisi terveydelle haitallisempaa kuin hemoglobiini, jossa hemi on kiinnittynyt proteiiniin. Prosessoituun lihaan lisätty nitriitti voi nitrolysoida hemiraudan, joka voi irtautua lihan myoglobiinista. Tämä vapaan nitrosohemin haitallisuus voisi selittää, miksi erityisesti prosessoitu liha lisää paksusuolisyövän riskiä (Pierre ym. 2010).

2.5 N-nitrosoyhdisteet

N-nitrosoyhdisteet (NOC, engl. N-nitroso compounds) ovat reaktiivisia typpiyhdisteitä, joissa nitrosoryhmä (-N=O) on kiinnittynyt typpiatomiin (Tricker 1997). Monet NOC:istä ovat mahdollisesti karsinogeneja eli syöpävaarallisia aineita (IARC 2014). N-nitrosoyhdisteitä saadaan ruokavaliosta, mutta niille altistutaan myös ympäristössä, kuten tupakoinnin ja kosmetiikkatuotteiden kautta (Tricker 1997). Ulkoisen altistuksen lisäksi NOC:itä muodostuu elimistössä sisäsyntyisesti, mikä on arviolta 45–75 % ihmisen kokonaisaltistumisesta NOC:ille.

Esimerkiksi prosessoidun lihan nitriitistä tai muusta nitrosoivasta yhdisteestä, joka pystyy luovuttamaan typpioksidin, voi muodostua mahalaukun happamissa olosuhteissa sekä suolistossa muun muassa sekundääristen ja tertiääristen amiinien kanssa N-nitrosoamiineja, jotka ovat NOC:itä (Tricker 1997, Oostindjer ym. 2014). Paksusuolen mikrobisto mahdollistaa N-nitrosaation (Massey ym. 1991). Nämä typpiyhdisteet poistuvat elimistöstä syljen, virtsan ja ulosteen mukana (Tricker 1997, Oostindjer ym. 2014).

2.5.1 N-nitrosoyhdisteiden yhteys paksusuolen syöpään

Epidemiologisia tutkimuksia NOC-altistuksen yhteydestä paksusuolen syöpään on melko vähän. Zhun ym. (2014) tapaus-verrokkitutkimuksessa (n=1760 paksusuolisyöpätapausta) erään N-nitrosoyhdisteen, NDMA:n (N-nitrosodimetyyliamiini), saanti ruoasta oli merkitsevässä yhteydessä paksusuolisyöpäriskiin paksusuolisyöpää sairastavilla henkilöillä. NOC-saantia mitattiin takautuvasti ruoankäyttökyselylomakkeella. Myös NOC:itä sisältävän prosessoidun lihan kulutus oli yhteydessä suurentuneeseen paksusuolen syöpäriskiin. Vanhemmassa suomalaisen väestöön pohjautuvassa etenevässä kohorttitutkimuksessa (n=9 985) havaittiin myös NDMA:n saannin olevan yhteydessä suurentuneeseen paksusuolisyöpäriskiin (Knekt ym. 1999). NOC:iden sisäsyntyistä muodostusta ei otettu altistuksessa huomioon. Toisessa laajemmassa etenevässä kohorttitutkimuksessa (n=23 363) ei havaittu yhteyttä paksusuolisyöpäriskin ja laskennallisesti mitatun N-nitrosoyhdisteen, NDMA:n, saannin tai sisäsyntyisen muodostuksen välillä (Loh ym. 2011). Sisäsyntyinen NOC:iden muodostus laskettiin teoreettisella laskentakaavalla. Sen sijaan NDMA:n saanti oli merkitsevässä yhteydessä peräsuolen alueen ja ruoansulatuselimistön syöpäriskiin (Loh ym. 2011).

2.5.2 Eläin- ja solututkimukset

Erilaisilla eläinmalleilla on havaittu, että punaista lihaa sisältävä ruokavalio verrattuna ei-lihaa sisältävään ruokavalioon lisää preneoplastisia leesioita (MDF, engl. mucin-depleted foci) jyrksijöiden paksusuoleessa (Pierre ym. 2013, Santarelli ym. 2013). MDF:ä pidetään suoliston esisyövällisinä muutoksina. NOC:iden esiasteita sisältävän hod dogin syöminen lisää hiirillä myös paksusuolen epänormaaleja kryptia (ACF, engl. aberrant crypt foci) kontrolliin verrattuna (Davis ym. 2012). ACF:ä pidetään myös paksusuolen syöpäkasvaimien esiasteina.

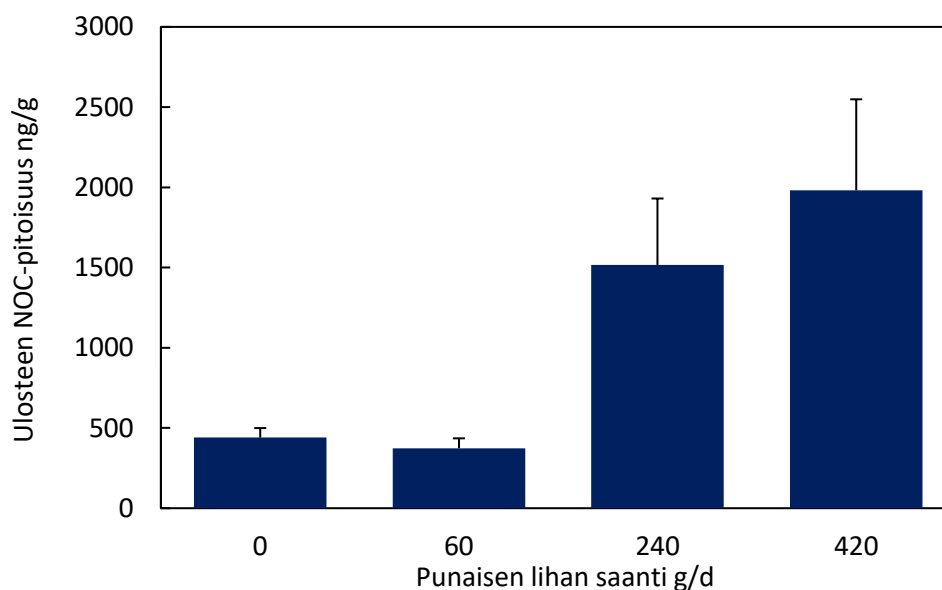
In vitro -tutkimuksessa paksusuolisyöpäsoluilla on havaittu NOC:iden vaikuttavan muun muassa syöpäsolujen jakautumiseen, apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan ja solujen signaalireitteihin (Hebels ym. 2011). NOC:iden mahdolliset vaikutustavat suoliston solujen toimintaan saattaa olla yhdistekohtaista. Ne voivat osallistua myös DNA:n O⁶-guaaniinin metylaatioon muodostaen addukteja eli eräänlaisia komplekseja, jotka voivat haitata DNA:n kahdentumista (Lewin ym. 2006). Tämä voi altistaa mutaatioille paksusuolisyövälle altistavissa geneeissä paksusuolen epiteelisoluissa. Koehenkilöillä on havaittu, että runsaasti punaista lihaa sisältävän ruokavalion noudattaminen verrattuna kasvisruokavalioon lisää NOC-riippuvaisten DNA-adduktien määrää suolistosta peräisin olevissa soluissa. Niiden määrä korreloi tutkimuksessa ulosteen NOC-pitoisuuden kanssa (Lewin ym. 2006).

2.5.3 N-nitrosoyhdisteiden analysointi

Ruoasta peräisin olevat sekä suolistossa muodostuvat NOC:et on mahdollista analysoida nestemäisistä näytteistä, kuten virtsasta ja ulosteesta, käyttäen niin kutsuttua ryhmäominaista denitrosaatiomenetelmää (Kuhnle ja Bingham 2007). NOC:et voidaan mitata homogenoidusta ulosteesta tai ulostevedestä, jossa ulosteen neste on suodatettu kuivasta aineesta. Ryhmäominaisessa denitrosaatiomenetelmässä näytteestä havaitaan vapautuva typpioksidi (NO) kemiluminesenssilla käyttäen denitrosaatiossa apuna esimerkiksi bromivety-(HBr) ja vetykloridi(HCl)-liuoksia. Tällä kemiallisella denitrosaatilla NO:a voi vapautua eri N-nitrosoyhdisteistä, kuten N-hemi-, N-tioli- ja O-nitrosoyhdisteistä, minkä takia menetelmällä mitatusta yhdisteestä käytetään nimitystä ATNC (Apparent total N-nitroso compounds). Muita epäsuoria menetelmiä avuksi käyttäen ATNC:stä voidaan erottaa muun muassa nitrosotioli- ja N-hemiyhdisteet, mikä parantaa menetelmän mittaustarkkuutta ja luotettavuutta (Kuhnle ja Bingham 2007).

2.5.4 N-nitrosoyhdisteet ja punainen liha

Bingham ym. (2002) ovat ryhmäominaista denitrosaatiomenetelmää käyttäen todistaneet terveillä mieskoehenkilöillä sisäsyntyisen NOC-pitoisuuden lisääntyvän annos-vastesuhteessa punaisen lihan (sian- ja naudanliha) syötiin nähden ulostenäytteistä mitattuna (kuva 1). Pienellä 60 gramman päiväannoksella ei ole merkitsevää vaikutusta ulosteen NOC-pitoisuuteen, mutta kun päivittäinen punaisen lihan määrä nousee yli 200 g/d, myös NOC-pitoisuus suurentuu merkitsevästi ja suurenee edelleen lihan määrän noustessa yli 400 gramman (Hughes ym. 2001). NOC-pitoisuus on ollut tutkittavilla riippumatonta tutkimusruokavalion noudattamisajasta (10–40 d). On havaittu, että mitä pidempään ruoka viipyy tutkittavien suolistossa, sitä suurempaa NOC-pitoisuus on (Hughes ym. 2001). Rotilla tehdyssä tutkimuksessa ulosteveden NOC-pitoisuus suureni pekonia sisältävällä ruokavaliolla verrattuna kontrolliin, mutta se ei suurentunut naudan-, sian- tai siipikarjanlihaa sisältävillä ruokavalioidella (Parnaud ym. 2000).



Kuva 1. Punaisen lihan syömisen vaikutus ulosteen NOC-pitoisuuteen (keskiarvo ja keskiahajonta) (mukailtu lähteestä Hughes ym. 2001).

NOC-mittausmenetelmän kehittyessä tutkimuksissa on alettu erotella NOC:istä myös N-tioli- ja N-hemiyhdisteitä. Kuhnle ym. (2007) vertasivat tutkimuksessaan 240 g punaista lihaa

sisältävän ruokavalion ja kasvisruokavalion vaikutusta NOC-muodostukseen. Tutkimuksessa kerättiin vapaaehtoisilta näytteet ohutsuolen sykkyräsuolesta ja ulostenäytteet. Verrattaessa tutkimushenkilöiden sykkyräsuolen tuotoksen ja ulosteen N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksia havaittiin N-hemiyhdisteiden pitoisuuden olevan merkitsevästi suurempi kuin N-tioliyhdisteiden. Tutkimuksen mukaan punaista lihaa sisältävän ruokavalion noudattaminen suurentaa ulosteen ja sykkyräsuolen sisällön N-hemi- ja N-tioliyhdisteiden pitoisuutta verrattuna kasvisruokavalion noudattamiseen. Näytteiden hemipitoisuus korreloi vahvasti N-hemiyhdisteiden pitoisuuden kanssa. Tutkijat havaitsivat testatessaan tutkimusruokavaliota ruoansulatusta jäljittelevässä mallissa, että tionitrosaatiota tapahtuu vatsankaltaisissa happamissa olosuhteissa. He arvelevat vatsassa tapahtuvan tionitrosaation olevan NOC:iden muodostuksen ensiaskel suolistossa (Kuhnle ym. 2007). Punaista lihaa sisältävässä interventiotutkimuksessa tutkittavien N-hemiyhdisteiden pitoisuus on ollut suurempaa kuin N-tioliyhdisteiden pitoisuus ulosteesta mitattuna (Joosen ym. 2010).

2.5.5 Siipikarjanlihan, kalan ja nitriitin vaikutus NOC-pitoisuuteen

Prosessoidun, nitriittiä sisältävän lihan, kuten pekonin ja kinkun, syöminen vaikutti ulosteen NOC-pitoisuuteen samalla tavalla kuin lisäaineeton punainen liha koehenkilöillä (Joosen ym. 2009). Valkoisella lihalla eli siipikarjanlihalla tai kalalla, ei havaittu vastaavaa vaikutusta (Bingham ym. 2002, Joosen ym. 2010). Binghamin ym. tutkimuksessa (2002) verrattiin 420 g ja 600 g punaisen lihan ja vastaavan määrän valkoista lihaa (siipikarjanlihaa ja vähärasvaista kalaa) vaikutusta ulosteen NOC-pitoisuuteen (n=12). NOC-pitoisuus suureni koehenkilöillä huomattavasti punaista lihaa sisältävällä ruokavaliolla verrattuna valkoista lihaa sisältävään ruokavalioon. Tutkimuksessa ei eroteltu N-nitrosoyhdisteitä. Joosenin ym. (2010) vaihtovuorokokeessa (n=14) tutkittiin punaisen lihan (325 g/d), kalan (375 g/d) ja sekaruokavalion (50 % kalaa, 50 % punaista lihaa) vaikutusta ulosteen NOC-pitoisuuteen. Ulosteen NOC-pitoisuus suureni merkitsevästi punaisen lihan määrän kasvaessa ruokavaliossa. Myös N-hemi- ja N-tioliyhdisteiden pitoisuudet suurenivat punaisen lihan osuuden kasvaessa verrattuna kalaa sisältävään ruokavalioon. Näistä N-hemiyhdisteiden pitoisuus oli merkitsevästi suurempi kaikilla tutkimusruokavalioidella.

2.5.6 Muiden ravintotekijöiden vaikutus N-nitrosoyhdisteisiin

Ruokavaliossa on havaittu olevan myös yhdisteitä, jotka mahdollisesti ehkäisevät NOC muodostusta; esimerkiksi kalsium pienentää ulosteen NOC-pitoisuutta niin jyrksijöillä kuin ihmisillä (Pierre ym. 2013, Santarelli ym. 2013). Pierren ym. tutkimukseen (2013) osallistui 18 tervettä miestä. He nauttivat kontrolloiduissa olosuhteissa plasebo-sokkoutetussa vaihtovuorokokeessa neljän päivän ajan ruokavaliota, joka sisälsi päivittäin 180 g sianlihaa sekä joko kalsiumlisää (1 g/d) tai vaihtoehtoisesti a-tokoferolia lihan mukana. Kalsiumlisää sisältävällä ruokavaliolla koehenkilöiden ulosteen NOC-pitoisuus oli merkitsevästi pienempi kuin pelkkää sianlihaa sisältävällä ruokavaliolla (Pierre ym. 2013). Resistenssin tärkkelyksen, teeuutteen, vihreiden kasvien tai α -tokoferolin lisääminen ruokavalioon ei ole vaikuttanut ulosteen NOC-pitoisuuteen vapaaehtoisilla, jotka ovat noudattaneet runsaasti punaista lihaa sisältävää ruokavaliota (Silvester ym. 1997, Hughes ym. 2002, Pierre ym. 2013). α -tokoferoli pienentää NOC-pitoisuutta kuitenkin eläinmallissa (Pierre ym. 2013). Soijalla sen sijaan havaittiin NOC-pitoisuutta pienentävä vaikutus koehenkilöillä runsaslihaisella ruokavaliolla (Hughes ym. 2002).

Russell ym. (2011) ovat havainneet, että proteiinin määrän lisääminen ja kuidun määrän pienentäminen ruokavaliossa lisää huomattavasti ulosteen NOC-pitoisuutta vapaaehtoisilla. Holtropin ym. (2012) interventiotutkimuksessa (n=16) tutkittiin erilaisten ruokavalioiden, elintarvikkeiden ja ravintoaineiden yhteyttä NOC muodostumiseen koehenkilöillä. Punaisen lihan syöminen oli yhteydessä ulosteen NOC-pitoisuuteen, kun puolestaan ruokavalion hiilihydraatit korreloivat käänteisesti NOC-pitoisuuteen. Regressioanalyysissä havaittiin, että sisäsyntyistä NOC-muodostusta selittää ylipainoisilla miehillä parhaiten ruokavalion punaisen lihan määrä sekä nitraatin, C-vitamiinin, energian ja ei-tärkkelyspolysakkaridien saanti.

2.6 Marjat ja paksusuolisyöpä

2.6.1 Kasvien, hedelmien ja marjojen yhteys paksusuolen syöpäriski

WCRF/AICR:n (2010) mukaan hedelmien ja marjojen paksusuolisyövältä ehkäisevästä vaikutuksesta on viitteellistä näyttöä. Laajaan EPIC-tutkimukseen (the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) perustuvan katsauksen mukaan paksusuolen syöpäriski

on 14 % pienempi henkilöillä, jotka kuluttavat hedelmiä ja vihanneksia eniten verrattuna vain vähän kuluttaviin (Bradbury ym. 2014). Marjat luokitellaan usein samaan ryhmään hedelmien kanssa. Suojaava yhteys havaitaan myös kuidun saannilla ja paksusuolisyöpäriskillä: riski on 17 % pienempi henkilöillä, jotka saavat kuitua eniten verrattuna vain vähän kuitua saaviin. EPIC-aineistosta tehdyn vielä uudemman tutkimuksen mukaan (Leenders ym. 2015) vihannesten ja hedelmien kulutus yhdessä on yhteydessä 13 % pienempään paksusuolisyöpäriskiin, kun verrataan kasviksia vähiten kuluttavia niitä eniten kuluttaviin. Tutkimuksen mukaan marjojen kulutus ei ole yhteydessä paksusuolisyöpäriskiin, kun niitä eniten kuluttavat söivät keskimäärin 21 g/d. Meta-analyysin, jossa oli mukana 22 epidemiologista tutkimusta, mukaan vihannesten ja hedelmien syönti on yhteydessä pienempään paksusuolen adenoomien riskiin (Ben Q ym. 2015). Vihannesten kulutus ei ole itsenäisesti merkitsevästi yhteydessä paksusuolisyöpäriskiin, mutta runsas hedelmien syönti (marjat mukaan luettuna) on yhteydessä pienentyneeseen paksusuolisyöpäriskiin.

2.6.2 Kasvisten, hedelmien ja marjojen saantisuositus ja kulutus Suomessa

Kasviksia kehoitetaan käyttämään runsaasti ja monipuolisesti päivittäin: noin puolikiloa kasviksia, marjoja ja hedelmiä päivässä, mikä vastaa noin 5–6 annosta (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Näistä marjojen osuudeksi suositellaan noin 2 annosta päivässä, mikä vastaa 2 dl. Kasvikset suositellaan käytettävän kypsentämättöminä ja sokeroimattomina. Suomessa miehistä 75 % syö tuoreita kasviksia päivittäin, naisista hieman isompi osa, 87 % (Helldán ym. 2013). Vihannesten ja hedelmien syönnissä jäädyään selvästi alle suositusten. Marjoja syö hyvin harva joka päivä – miehistä 14 % ja naisista 28 %. Miehet syövät niitä keskimäärin 18 g ja naiset 25 g päivässä. 65–74-vuotiaat syövät marjoja lähes kaksinkertaisesti työikäisiin nähden. Verrattuna Finravinto 2007 -tutkimuksen tuloksiin (Paturi ym. 2008) vuonna 2012 kasvisten ja kasvisruokien kulutus hieman nousi sekä miehillä että naisilla, mutta hedelmien ja marjojen kulutus laski (Helldán ym. 2013).

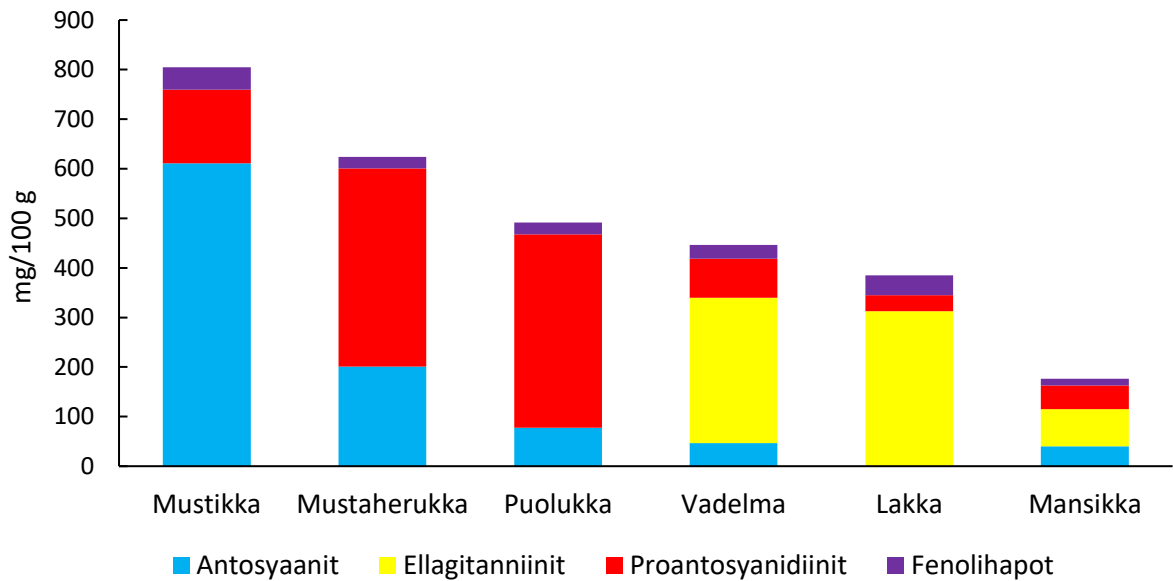
2.7 Marjojen polyfenolit

Marjat sisältävät energiaravintoaineista eniten hiilihydraatteja. Ne ovat hyvä kuidun lähde ja sisältävät paljon myös muita ravintoaineita, kuten C- ja E-vitamiinia sekä polyfenoleja (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2016). Polyfenolit ovat niin kutsuttuja fytokemikaaleja (Manach ym. 2004). Kasvipäriset fytokemikaalit eivät ole ravintoaineita eli niillä ei tiettävästi

ole välttämättömiä tehtäviä elimistössä kuten esimerkiksi vitamiineilla, mutta ne voivat olla elimistölle ja suolistolle hyödyllisiä. Marjat sisältävät runsaasti polyfenoleja, joita kasvit muodostavat omiksi puolustusmekanismeiksi. Rakenteeltaan fenoli on aromaattinen rengas, johon on liittynyt hydroksyyli-ryhmä. Polyfenolit voidaan luokitella ryhmiin rakenteensa mukaan, kuten aromaattisen renkaan määrän tai niiden liityntätavan perusteella. Usein polyfenolit luokitellaan seuraavasti: flavonoidit, fenolihapot, tanniinit, lignaanit ja stilbeenit. Nämä voidaan edelleen jakaa moniin eri alaluokkiin (Manach ym. 2004).

2.7.1 Marjojen polyfenolipitoisuus

Suomalaisen tutkimuksen mukaan marjat ovat yleisesti polyfenolipitoisuudeltaan ylivoimaisia muihin polyfenoleja sisältäviin elintarvikkeisiin verrattuna (Ovaskainen ym. 2008). Kahdestakymmenestä eniten polyfenoleja sisältävästä elintarvikkeesta jopa 16 on marjoja. Muut kahdestakymmenestä ovat tumma suklaa, kaakaojauhe, maapähkinä sekä rukiin ja vehnän leseet. Eri polyfenoliryhmien pitoisuus vaihtelee merkittävästi kasvista toiseen. Flavonoideista marjat sisältävät paljon esimerkiksi flavonoleja ja antosyanidiineja, joita on runsaasti erityisesti sinisissä ja mustissa marjoissa. Fenolihapoista marjat sisältävät paljon puolestaan hydroksikanelihappoa ja tanniineista ellagitanniineja ja proantosyanidiineja. Ellagitanniineja on erityisesti mansikoissa, vadelmissa ja lakassa (Ovaskainen ym. 2008). Kuvassa 2 on Suomessa yleisesti käytettyjen marjojen keskimääräisiä polyfenolipitoisuuksia.



Kuva 2. Suomessa yleisesti käytettyjen marjojen polyfenolien keskimääräisiä pitouksia mg/100 g (mukailtu lähteistä Mattila ym. 2006, Koponen ym. 2007, Hellström ym. 2009).

2.7.2 Polyfenolien saanti

Arvion mukaan Yhdysvalloissa polyfenolien saanti on keskimäärin 1 g/d henkilöillä, jotka käyttävät vihanneksia ja hedelmiä säännöllisesti (Manach ym. 2004). Niiden saantia on kuitenkin vaikea arvioida ruoankäytön tutkimusmenetelmillä, koska monien polyfenolien pitoisuuksia on vain harvoissa elintarvikkeiden koostumustietokannoissa, eikä niiden pitkäaikaissaantiin ole vielä luotettavaa biomarkkeria. Suomalaisten keskimääräinen polyfenolien saanti on noin 860 mg/d (Ovaskainen ym. 2008). Taulukossa 2 on suomalaisten keskimääräinen polyfenolien saanti Finravinto 2002 -tutkimuksen mukaan. Miehillä polyfenolien saanti ruoasta on absoluuttisesti suurempaa kuin naisilla, mutta energiavakioituna tilanne on päinvastainen – naisilla saanti on suurempaa kuin miehillä. Suomalaiset saavat polyfenoleja ylivoimaisesti eniten kahvista. Sen jälkeen parhaimmat saantilähteet ovat viljatuotteet, tee ja hedelmät. Tutkimuksen mukaan päivittäisestä polyfenolien saannista vain vajaa 4 % saadaan keskimäärin marjoista ja marjaruoista, vaikka marjojen polyfenolipitoisuus on suuri. Kuitenkin tiettyjen polyfenoliryhmien saannista vastaavat lähes kokonaan marjat, marjaruoat ja -mehut, esimerkiksi ellagitanniineista 99 %, antosyanidiineista 88 % ja proantosyanidiineista 47 % saadaan marjoista. Antosyanidiineja saadaan pääasiassa mustikoista (Ovaskainen ym. 2008).

Taulukko 2. Suomalaisten keskimääräinen polyfenolien saanti luokittain (Finravinto 2002 - tutkimus) (mukailtu lähteestä Ovaskainen ym. 2008).

Yhdiste (mg/d) ¹	Kaikki	Naiset	Miehet
Polyfenolit yhteensä	863 ± 415	817 ± 368	919 ± 458**
Kahvihappo	417 ± 325	359 ± 271	487 ± 368*
Ferulahappo	120 ± 60	103 ± 4	139 ± 67**
p-kumariinihappo	16 ± 7,5	15 ± 6,5	17 ± 8,5**
Sinappihappo	11 ± 6,6	10 ± 5,3	12 ± 7,6**
Anytosyanidiinit	47 ± 79	53 ± 76	43 ± 82**
Flavonoidit	33 ± 43	37 ± 44	27 ± 43**
Proantosyanidiinit	128 ± 120	139 ± 121	115 ± 118**
Ellagitanniinit	12 ± 37	15 ± 43	8 ± 28**
Isoflavonoidit	0,9 ± 3,9	1,0 ± 4,8	0,8 ± 2,6**
Ligtaanit	0,9 ± 5,7	1,4 ± 7,5	0,4 ± 2,1**
Karotenoidit	5,9 ± 4,7	6,2 ± 4,6	5,6 ± 4,7
Sterolit	368 ± 427	322 ± 398	424 ± 453**

¹Arvot ovat keskiarvoja ± keskihajonta, n= 2007 (1095 naista ja 912 miestä).

**Ero naisten ja miesten välillä, p-arvo <0,01.

2.7.3 Polyfenolien imeytyminen

Polyfenolit imeytyvät melko huonosti ruoansulatuselimistöstä (Tarko ym. 2013). Imeytyäkseen ne vaativat usein hydrolyysiä ruoansulatusentsyymien tai mikrobiston avulla. Kasvipäristen polyfenolien ruoansulatus ja imeytyminen alkaa mahalaukussa, mutta pääasiassa ne imeytyvät ohut- ja paksusuoleessa. Arvion mukaan noin 50 % polyfenoleista kulkeutuu paksusuoleen, josta osa jää edelleen imeytymättä. Lopulta ne poistuvat elimistöstä virtsan, sappihapon ja ulosteen mukana (Manach ym. 2004).

Polyfenolit voivat liittyä ruoan eri komponentteihin, kuten proteiineihin, polysakkarideihin ja rautaan, mikä voi vaikuttaa, suoliston olosuhteiden ohella, ravintoaineiden imeytymiseen. Ei ole kuitenkaan tarkkaa tietoa siitä, miten ruokavalion eri komponentit vaikuttavat polyfenolien imeytymiseen tai hyväksikäytettävyyteen. Luultavasti niiden imeytyminen on suurempaa, jos polyfenoleja nauttii puhtaana yhdisteenä kuin jonkun ruoan mukana. Tämä toisaalta saattaa vähentää niiden vaikutuksia suolistossa (Manach ym. 2004).

Polyfenolit voivat kulkeutua elimistössä eri kudoksiin, mutta tiettävästi niitä ei varastoida elimistössä. Plasman polyfenolipitoisuudet vaihtelevat yhdisteen ja sen imeytymisen mukaan. Polyfenolit ja niiden metaboliitit poistuvat yleensä nopeasti plasmasta, joten niiden lähteitä on nautittava säännöllisesti päivittäin, jotta veren polyfenolipitoisuus säilyy. Ne voivat osallistua myös sappihappokiertoon, jolloin ne pysyvät elimistössä mahdollisesti pidempään (Manach ym. 2004).

2.7.4 Marjojen polyfenolimetaboliitit

Monien polyfenolien pitoisuus verenkierrassa on hyvin pieni, eivätkä ne kaikki erity virtsan ja ulosteen mukana, minkä takia on herännyt kiinnostus niiden aineenvaihduntatuotteisiin (Williamson ja Clifford 2010). Arvellaan, että polyfenolien vaikutukset elimistöön selittyisivät ainakin osittain niistä muodostuvien polyfenolimetaboliittien avulla. Useimpia polyfenolimetaboliitteja ei ole elintarvikkeissa sellaisenaan. Imeytymättömät polyfenolit siirtyvät ohutsuolesta paksusuoleen, jossa ne voivat muuntua jossain määrin erilaisiksi aineenvaihduntatuotteiksi eli polyfenolimetaboliiteiksi suoliston mikrobiston avulla. Polyfenolimetaboliitit ovat mahdollisesti paremmin imeytyviä kuin niiden lähtöaineet, ja niiden pitoisuus suolistossa voi olla hyvinkin suuri (Manach ym. 2004). Osa polyfenolien metaboliatuotteista on hyvin yhdistekohtaisia. Usein tiettyä metaboliittia muodostuu monesta eri lähteestä, joten oletettavasti aineenvaihduntatuotteita on suppeampi määrä kuin niiden lähtöaineita. Nähtäväksi jää, voidaanko polyfenolimetaboliitteja tulevaisuudessa käyttää polyfenolien saannin biomarkkerina (Manach ym. 2004). Epäselvää edelleen on, miten polyfenolimetaboliitteja muodostuu, miten ne imeytyvät ja millainen niiden hyväksikäytettävyys elimistössä on (Núñez-Sánchez ym. 2015). Esimerkiksi antosyaanien hyväksikäytettävyys sellaisenaan on huono, joten ne vaikuttavat luultavasti metaboliittiansa kautta suolistossa.

Marjojen sisältämien polyfenolien metaboliitteja tunnetaan vielä melko vähän (Puupponen-Pimiä ym. 2013). Yksi esimerkki erityisesti marjojen polyfenolimetaboliiteista on urolitiini, jota muodostuu ellagitanniinista suoliston mikrobiston avulla. Eräässä *in vivo* -tutkimuksessa nautittu ellagiinihappo muuntui 80 %:sti urolitiineiksi (González-Barrio ym. 2011) Urolitiinin tuotto on kuitenkin hyvin yksilöstä riippuvaa, mitä saattaa selittää suoliston erilainen

mikrofloora (Cerdá ym. 2005, Truchado ym. 2012). Luultavasti kaikki henkilöt eivät pysty tuottamaan urolitiinia. Suoliston metaboliitteja voidaan mitata massaspektrometrillä muun muassa virtsasta tai ulostenäytteestä eristetystä ulostevedestä. Tutkimusten mukaan on näyttöä siitä, että eri polyfenoliyhdisteet vaikuttavat eri tavoin paksusuolen bakteerikantoihin, ja toisaalta henkilöiden erilainen suoliston mikrobisto vaikuttaa polyfenolien hyväksikäytettävyyteen elimistössä (Puupponen-Pimiä ym. 2013).

Eräs tutkimusryhmä (Dall’Asta ym. 2012) tutki *in vitro* -tutkimuksessa ihmisulosteen fermentoinnin vaikutusta polyfenolien metaboliitteihin. Marjoista tutkimuksessa oli mukana vadelma, mansikka ja mustikka. Polyfenolimetaboliittien mittauksessa käytettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografia ja detektorina tandem-massaspektrometriä. Metaboliittipitoisuudet mitattiin viiden ja 24 tunnin fermentoinnin jälkeen. Vadelmien lopputuotteesta mitattiin protokatekiini- ja bentsoehappoa, mustikoista protokatekiini-, gallus-, kumariini-, kiini-, dihydrokahvi- ja hydroksibentsoehappoa sekä mansikoista kiini- ja gallushappoa. Lähtöaineita mitattiin huomattavasti laajempi määrä kuin niiden metaboliitteja. Gill ym. (2010) tutkivat puolestaan vadelmapyreen vaikutusta ulosteveden polyfenolien pitoisuuteen. Tutkimukseen osallistui kymmenen 27–60-vuotiasta vapaaehtoista miestä, ja he nauttivat neljän vuorokauden ajan 200 g vadelmapyrettä tavanomaisen ruokavalion ohella. Polyfenolimetaboliitit mitattiin ulostevedestä nestekromatografi-massaspektroskopiolla. Tutkimuksessa ulosteesta havaittiin 20 eri polyfenolia ja niiden metaboliittia. Minkään metaboliitin pitoisuus ei noussut kaikilla tutkittavilla merkitsevästi, mutta yli puolella tutkittavista fenyylietikka-, 4-hydroksifenyylietikka-, 3-hydroksifenyylietikka- ja 3-(4-hydroksifenyyli)propioni- ja protokatekiinihappojen pitoisuudet suurensivat merkitsevästi. Kahdella tutkittavista merkitsevä pitoisuuden nousu oli myös 3-,4-dihydroksifenyylietikkahapon ja sinappihapon pitoisuuksissa ja yhdellä kahvihapon pitoisuudessa. Polyfenolimetaboliittien pitoisuudet vaihtelivat paljon tutkittavien välillä (Gill ym. 2010).

2.8 Marjojen, polyfenolien ja niiden metaboliittien yhteys paksusuolisyöpään

2.8.1 Epidemiologiset tutkimukset

Polyfenolien saannin yhteyttä terveyteen on tutkittu väestötutkimuksissa, mutta tutkimuksia liittyen paksusuolen syöpäriskiä on vähän (Núñez-Sánchez ym. 2015). Haasteena usein on muun muassa puutteellinen elintarvikkeiden polyfenolitietokanta. Cochrane-katsauksessa tarkasteltiin, onko ravinnosta saatavat tietyt polyfenolit, flavonoidit, yhteydessä paksusuolikasyövän ilmaantuvuuteen tai paksusuolisyöpään (Jin ym. 2012). Meta-analyysissä oli mukana yhteensä 8 tutkimusta. Sen mukaan ei ole tarpeeksi näyttöä siitä, että flavonoidien kokonaissaanti tai yksittäisten yhdisteiden saanti olisi yhteydessä pienentyneeseen paksusuolisyöpäriskiä. Katsauksen mukaan asiaa tulisi tutkia tarkemmin kontrolloiduilla kokeilla ja puhtailla yhdisteillä (Jin ym. 2012).

2.8.2 Solu- ja eläinkokeet

Tieteellisissä katsauksissa on käyty läpi tutkimusnäyttöä polyfenolilähteiden eli marjojen ja marjauutteiden sekä niistä eristettyjen polyfenolien vaikutuksia paksusuolisyöpään eri solu- ja eläinmalleissa (Brown ym. 2014, Núñez-Sánchez ym. 2015). Marjojen ja erilaisten marjauutteiden vaikutusta on tutkittu melko paljon paksusuolen kasvainsolulinjoilla (Brown ym. 2014, Núñez-Sánchez ym. 2015). Marjojen polyfenolit voivat esimerkiksi kelatoida metalleja, kuten rautaa, ja estää haitallisten happiradikaalien reaktioita. Useilla polyfenoleilla on todettu korkeaa antioksidanttista vaikutusta solukokeissa, mutta voimakkuus riippuu yhdisteestä ja sen biologinen aktiivisuus suolistossa voi olla erilainen. On mahdollista, että polyfenolien antioksidanttivaikutus tapahtuu välillisesti polyfenolin vaikuttaen esimerkiksi solujen reseptoreihin ja sitä kautta aktivoitujen solun sisäisiä puolustusreaktioita. Polyfenoleilla ja niiden metaboliiteilla on todettu myös DNA:ta suojaavia vaikutuksia erityisesti inhiboimalla oksidatiivista stressiä ja reaktiivisten happiradikaalien reaktioita (Brown ym. 2014).

Mustavadelma- ja mustikkauutteen on havaittu vähentävän solukokeissa esimerkiksi syöpäsolujen proliferaatiota eli lisääntymistä ja apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa (Núñez-Sánchez ym. 2015). Coates ym. (2007) tutkivat *in vitro* -tutkimuksessa vadelmauutteen vaikutusta paksusuolisyövän soluihin. Vadelmauute inhiboi syöpäsolujen solusykliä pitäen

solusykliä pysähtyneenä. Uute myös rajoitti syöpäsolujen leviämistä *in vitro* -kokeessa. Marjoista, erityisesti mustikoista, uutettujen proantosyanidiinien, on havaittu käynnistävän syöpäsolujen apoptoosia *in vitro* -kokeessa (Minker ym. 2015). Tutkimuksessa mustikoista tehty proantosyanidiini-uute vaikutti useita muita marjauutteita paremmin ihmisen paksusuolisyöpäsolujen apoptoosiin. Mustikka aktivoi erityisesti solun ulkopuolelta tulevia signaalireittejä, jotka ohjelmoivat solukuolemaa (Minker ym. 2015).

Melko vähän on tutkimuksia, joissa olisi tutkittu puhtaitten polyfenolien tai niiden metaboliittien vaikutuksia syöpäsoluihin. Ruotsalainen tutkimusryhmä (Janicke ym. 2011) tutki ferulahapon ja p-kumariinihapon vaikutusta paksusuolen syöpäsolujen solujakautumiseen ja sitä kontrolloivien geenien aktiivisuuteen. Tutkimuksessa havaittiin sekä ferula- että p-kumariinihapon vaikuttavan solusykliä kontrolloiviin geneihin hidastamalla solun jakautumista. p-kumariinihappo vaikutti suurempaan joukkoon paksusuolikasvainsolujen genejä verrattuna ferulahappoon ja erityisesti inaktivoi niitä (Janicke ym. 2011). Solukokeissa on saatu näyttöä myös tiettyjen polyfenolien, flavonoidin ja isoflavonoidin, vaikuttavan syöpäsolujen angiogeneesiin eli verisuonien muodostumiseen, mikä on oleellista syöpäsolujen energiansaannin kannalta (WCRF/AICR 2007).

Erilaisilla eläinmalleilla, kuten Fisher 344 -rotilla sekä ApcMin-hiirillä, on tutkittu marjojen kuten mustikoiden, mustavadelmien ja mustikoista eristetyn antosyaaniuutteen vaikutusta ACF:ien muodostukseen, paksusuolen adenoomiin sekä erilaisiin syöpämarkkereihin (Brown ym. 2014, Núñez-Sánchez ym. 2015). Marjoja sisältävät ruokavaliot ovat kestäneet eläimillä noin 10–14 viikkoa. Näiden tutkimusten mukaan tutkimusmarjojen syönti on vähentänyt eläinmalleissa paksusuolen adenoomien sekä ACF:ien määrää sekä vaikuttanut syöpäsolujen signaalireitteihin. Marjoilla, erityisesti mustikoilla ja mustavadelmilla, on solu- ja eläinkokeissa havaittu useita paksusuolisyöväältä ehkäiseviä vaikutuksia (Brown ym. 2014, Núñez-Sánchez ym. 2015).

2.8.3 Kliiniset tutkimukset

Kliinisiä tutkimuksia liittyen marjoihin ja paksusuolisyöpään on tehty muutamia ihmisillä; marjojen polyfenolien vaikutusta paksusuolisyöpään on tutkittu ainakin neljässä kliinisessä tutkimuksessa paksusuolisyöpää sairastavilla potilailla (Núñez-Sánchez ym. 2015). Tutkittavat

ovat nauttineet eri määriä muun muassa mustavadelmia ja mustikkauutetta tutkimuksien keston vaihdellen seitsemästä vuorokaudesta yhdeksään kuukauteen. Tutkimusmarjoilla on ollut vaikutusta syöpäkasvaimen kasvuun vaikuttavien geenien aktiivisuuteen ja erilaisiin syöpäsolujen signaalireitteihin. Interventiotutkimuksissa on tutkittu myös eri marjauutteiden vaikutusta valkosolujen DNA:n vaurioihin vapaaehtoisilla ihmisillä (Brown ym. 2014). Kaikissa tutkimuksissa suotuisia vaikutuksia ei ole kuitenkaan havaittu ja osassa tutkimuksia ei ole ollut kunnan kontrolliryhmää (Brown ym. 2014). Näiden perusteella on viitteellistä näyttöä mustavadelma- ja mustikkauutteiden vaikutuksesta paksusuolisyöpään, mutta kliinisiä tutkimuksia on vielä melko vähän.

2.8.4 Vaikutukset N-nitrosoyhdisteisiin

Leen ym. tutkimuksen mukaan (2006) flavanoli epikatekiini ja sen dimeerimuoto inhiboivat typpihapokkeen aiheuttamaa erään N-nitrosoyhdisteen, N-nitrosoamiinin (N-nitrosodimetyyliemiini), muodostusta. Typpihapokkeen ja epikatekiinin reaktio sai aikaan nitrosoituja flavanoleja happamissa, vatsalaukunkaltaisissa olosuhteissa. Kokeellisissa olosuhteissa ei havaittu nitrosoidun epikatekiinin imeytymistä ohuotsuolesta. Nitrosoitu epikatekiinin monomeeri ja dimeerimuoto estivät paksusuolen syöpäsolujen solusykliä enemmän kuin ei-nitrosoitu muoto. Nitrosoflavanolien ei havaittu olevan toksisia tavallisille ihmisluille. Epikatekiinin dimeeri aktivoi myös syöpäsolujen apoptoosia. Tämän tutkimuksen perusteella on mahdollista, että polyfenolit ja niiden metaboliitit saattavat inhiboida karsinogeenisten N-nitrosoyhdisteiden muodostusta suolistossa (Leen ym. 2006). Marjojen tai niiden sisältämien polyfenolien vaikutusta N-nitrosoyhdisteiden muodostukseen ei ole tutkittu aiemmin punaisen lihan yhteydessä. Russell ym. (2011) ovat havainneet, että proteiinin määrän lisääminen ja kuidun määrän pienentäminen ruokavaliossa vähentää polyfenolien ja niiden metaboliittien pitoisuutta ulostevedessä verrattuna hiilihydraattipitoisempaan ruokavalioon vapaaehtoisilla.

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE

Tämän tutkimuksen päätavoitteena oli tutkia, vaikuttaako marjojen syöminen sianlihaa sisältävällä ruokavaliolla N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuteen terveillä koehenkilöillä ja pienentääkö se NOC-pitoisuutta ulosteesta mitattuna. Sen lisäksi tutkittiin, vaikuttaako marjojen syönti ulosteen polyfenolien pitoisuuteen. Tutkimuksessa ulostenäytteistä eristetyistä ulostevedestä mitattiin tiettyjen polyfenolien ja niiden metaboliittien pitoisuuksia. Nämä polyfenolimetaboliitit ovat muun muassa marjojen sisältämien polyfenolien aineenvaihduntatuotteita. Tutkimuksessa vertailtiin myös kahden ruokavalioryhmän ravintoaineiden saantia tutkimuksen alussa sekä lopussa ruokapäiväkirjojen perusteella. Sen lisäksi tarkasteltiin ravintoaineiden saantien yhteyttä N-nitrosoyhdisteiden ja polyfenolimetaboliittien pitoisuuksiin.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Tutkimusasetelma ja aineisto

KarniMari-tutkimus on Helsingin yliopiston, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen, vuoden 2014 syksyllä toteuttama neljä viikkoa kestänyt interventiotutkimus, jossa on kaksi eri tutkimushaaraa ja kolme ruokavalioryhmää. Toinen tutkimushaara tutki rasvahappokoostumukseltaan muokatun sianlihan vaikutusta seerumin rasvapitoisuuksiin terveillä ihmisillä. Tässä tutkimuksessa raportoidaan vain tutkimuksen toisesta haarasta, jossa tutkitaan marjojen vaikutusta muun muassa ulosteen metaboliitteihin sianlihaa sisältävällä ruokavaliolla. Tähän tutkimushaaraan kuuluu kaksi eri ruokavalioryhmää. Tässä tutkimuksessa ne on nimetty ”kontrolli-” ja ”marjaryhmiksi”.

KarniMari-tutkimukseen rekrytoitiin alkujaan 72 perustervettä suomalaista aikuista, naista sekä miestä. Kolme henkilöä keskeytti tutkimuksen jo ennen sen alkua, joten lopulta $n = 69$, joista 45 osallistui suolisto-osuuden tutkimukseen. Iältään he olivat 20–67-vuotiaita. Tämä tutkimushaara toteutettiin rinnakkaisasetelmalla, jossa oli kaksi eri ruokavalioryhmää, joihin tutkittavat satunnaistettiin. Rekrytointi tapahtui Helsingin yliopiston ainejärjestöjen postituslistojen, Facebookin ja Helsingin yliopiston intranetin kautta sekä tiedottamalla tutkimuksesta ennen luentoja Viikin yliopistokampuksella. Tutkimuskoordinaattori tapasi kaikki tutkittavat ennen tutkimuksen alkua. Tutkittaville kerrottiin tuolloin henkilökohtaisesti tutkimuksesta ja samalla selvitettiin heidän taustatiedot ja terveydentila sekä allekirjoitettiin suostumuslomake. Osallistuminen oli täysin vapaaehtoista ja tutkittavilla oli mahdollisuus keskeyttää tutkimus niin halutessaan. Poissulkukriteereinä tutkimuksessa olivat runsas ravintolisien käyttö (mm. kalaöljykapselit), runsas kalansyönti (yli 4 annosta viikossa), rasva-aineenvaihduntaan tai verenpaineeseen vaikuttavien lääkkeiden käyttö, tupakointi, erittäin korkea seerumin kolesterolipitoisuus, runsas raskaan ruumiillisen rasituksen harrastaminen sekä raskaus ja imetys.

4.2 Voimalaskelma

Tutkimuksen alkuperäinen voimalaskelma ($n = 20$) on laskettu KarniMari-tutkimuksen toisen tutkimushaaran mukaan ($\alpha:n$ ollessa 5% ja $\beta:n$ 10%), missä tutkittiin rasvahappokoostumukselta muokatun sianlihan nauttimisen vaikutusta seerumin rasvahappopitoisuuksiin.

4.3 Tutkimusruokavalio

Tutkimukseen kuului kaksi eri ruokavalioryhmää, marja- ja kontrolliryhmät. Molemmat tutkimusryhmät nauttivat päivittäin kaksi annosta sianlihatuotteita ja sen lisäksi marjaryhmä nautti päivittäin myös noin 200 g marjoja tavanomaisen ruokavalionsa ohella yhtäjaksoisesti neljän viikon ajan. Liitteessä 1 on ohje tutkimusruokavalioiden noudattamisesta ja rajoituksista. Tutkimustuotteet tarjottiin tutkittaville ja lihatuotteet toimitti HKScan Finland Oy. Tutkimustuotteet olivat sianjauheliha, fileesuikale, pekoni, nakki, grillimakkara, kokolihaleikkele ja nyhtöpossu. Liitteessä 2 on esitetty tutkimustuotteiden ainesosat tarkemmin. Tuotteet oli annosteltu pakkauksiin valmiiksi. Päivässä tuli syödä kaksi liha-annosta, yhteensä noin 150 g punaista lihaa päivässä (katso liite 3 ohjeistus lihatuotteiden syömisestä). Tuotteita sai syödä vaihtelevasti päivittäin, mutta kokolihaleikkelettä ja fileesuikaletta ei saanut syödä samana päivänä niiden alhaisen rasvapitoisuuden takia verrattuna muihin tutkimustuotteisiin. Toinen tutkimusryhmä söi sianlihan lisäksi noin 200 gramman marja-annoksen päivässä (liite 4). Jokaisen tutkimusviikon aikana marjaryhmäläiset söivät 400 g mustikkaa, 250 g mansikkaa, 200 g puolukkaa, 200 g vadelmaa, 200 g mustaherukkaa ja 200 g lakkaa eli 1450 g marjoja/vk. Marjat olivat suomalaisia ja ne tarjottiin pakasteina. Marjat sai syödä joko erikseen tai sekoittaen eri marjoja samalla aterialla.

Tutkittavat saivat valmistaa tutkimustuotteet haluamallaan tavalla, mutta heille annettiin niin halutessa ruokareseptejä auttamaan tutkimustuotteiden nauttimista. He eivät saaneet syödä muita marjatuotteita tai punaista lihaa (naudan-, sian-, lampaan- tai riistaeläimen lihaa) tutkimusruokavalioiden aikana (katso liitteet 1 ja 3). Siipikarjanlihaa he saivat syödä normaalisti, mutta kalan syöntiä heidän tuli rajoittaa kahteen kertaan viikossa. Muuten ruokavalio oli vapaa. Tutkimustuotteet tuli nauttia päivittäin, mutta jos jokin tuote jäi syömättä, tuli se syödä seuraavana päivänä. Tuotteiden nauttimista tutkimusjakson aikana seurattiin

viikoittain kerättävien ruokapäiväkirjojen (1 d) avulla sekä suoraan kysymällä tutkittavilta tuotteiden syömisestä viikoittaisissa tuotteiden nouto- sekä painon punnitustapaamisissa.

4.4 Menetelmät

Tutkimushenkilöiltä mitattiin paino, pituus, verenpaine ja veren hemoglobiinipitoisuus. Heiltä otettiin laskimoverinäytteet, joista mitattiin plasman kolesterolipitoisuudet. Tutkittavat antoivat myös ulostenäytteet N-nitrosoyhdisteiden ja polyfenolien ja niiden metaboliittien mittausta varten. Ruoankäyttöä mitattiin ruokapäiväkirjojen avulla. Tutkittavat pitivät myös oirepäiväkirjaa tutkimuksen ajan.

4.4.1 Ruoankäytön mittaaminen

Tutkittavien ruoankäyttöä mitattiin tutkimuksen alussa, ennen tutkimusruokavalion noudattamista (vk 0), ja lopussa, ennen tutkimusruokavalion lopettamista (vk 4), kolmen vuorokauden ruokapäiväkirjalla (sisältäen kaksi arkipäivää ja yksi viikonloppupäivä) sekä tutkimuksen aikana viikoittain yhden vuorokauden ruokapäiväkirjalla (3 kpl). Tässä tutkimuksessa raportoidaan ruoankäyttö ja ravintoaineiden saanti vain näiden kolmen vuorokauden ruokapäiväkirjojen pohjalta viikoilta 0 ja 4. Tutkimushenkilökunta ohjeisti tutkittavia ruokapäiväkirjan pitoon ja antoi siihen tarkat kirjalliset ohjeet. Ruokapäiväkirjaa pidettiin kirjallisesti ja ne palautettiin aina seuraavana tapaamiskertana joko tutkimustuotteita noutaessa tai tutkimusmittauksiin tultaessa. Henkilökunta tarkasti ruokapäiväkirjat henkilökohtaisesti tutkittavien kanssa niiden palauttamisen yhteydessä. Ruokapäiväkirjojen ravintoainelaskelmat tehtiin AivoDiet-ohjelmalla (Aivo Finland Oy), joka käyttää koostumustietokantanaan THL:n (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos) ylläpitämää Fineli-elintarvikkeiden koostumustietokantaa. Kaikki ruokapäiväkirjat tallensi sama koulutettu henkilö. Marjojen ja punaisen lihan absoluuttinen kulutus laskettiin AivoDiet -ohjelmasta mekaanisesti reseptien pohjalta (tutkimusviikot 0 ja 4).

4.4.2 Paino, pituus, verenpaine ja verinäyte

Rinnakkaisasetelmalla toteutetussa tutkimuksessa mittaukset tehtiin ja näytteet otettiin tutkimuksen alussa, ennen tutkimusruokavalion aloitusta (vk 0), ja lopussa, ennen tutkimusruokavalion lopettamista (vk 4). Tutkittavat punnittiin kerran viikossa painon seuraamiseksi samaa vakaa käyttäen. Pituus mitattiin stadiometrillä. Painon ja pituuden avulla

laskettiin painoindeksi (BMI, engl. Body Mass Index, massa jaettuna pituuden neliöllä). Verenpaine mitattiin automaattisella verenpainemittarilla (Omron M6). Paastoverinäytteet tutkittavilta ottivat koulutetut sairaan- ja terveydenhoitajat. Näytteestä määritettiin hemoglobiinipitoisuus heti näytteenoton yhteydessä (HemoCue). Verinäytteistä eroteltiin plasma, josta mitattiin tutkittavien kokonais-, LDL- ja HDL-kolesterolipitoisuus sekä triglyseridipitoisuus. Nämä mitattiin automaattianalysointilaitteella (Konelab 20, Thermo Electron, Suomi) Helsingin yliopiston Ravitsemustieteen osastolla.

4.5 Ulostenäytteet

4.5.1 Ulostenäytteiden keräys

Tutkimushenkilökunta neuvoi jokaista tutkittavaa henkilökohtaisesti ulostenäytteiden otossa ennen tutkimuksen alkua. Tutkittaville annettiin tätä varten tarvittavat välineet ja ohjeet kotiin (liite 5). Tutkittavat keräsivät ulostenäytteet (noin 20 g) yhdestä tuotoksesta kahdelta peräkkäiseltä vuorokaudelta ennen tutkimusruokavalion noudattamista (vk 0) ja tutkimuksen lopussa (vk 4, yhteensä neljä näytettä/hlö). Kaikki suolen tuotos punnittiin kahden vuorokauden ajalta digitaalivaa’alla, ja sen lisäksi molemmilta päiviltä kerättiin yksi näyte muovipurkkiin, joka säilytettiin pakastettuna ja kuljetettiin tutkimushenkilökunnalle kylmälaukussa kylmävaraajien kanssa. Näytteet säilytettiin -20 °C:ssa analyysija varten Helsingin yliopistossa Ravitsemustieteen osastolla.

4.5.2 Ulostenäytteiden käsittely

Ulostenäytteiden käsittelymenetelmää testattiin ensin kokeilunäytteillä menetelmän toimivuuden varmistamiseksi. Analyysija varten jokaiselta tutkimushenkilöltä valittiin kahdesta ulosteen alkunäytteestä massaltaan suurempi ns. päänäyte ja toinen vuorokausinäyte jätettiin käsittelemättä. Loppunäytteistä molempien vuorokausien näytteet yhdistettiin sulatuksen jälkeen. Näytteiden käsittelyä varten valitut näytteet otettiin sulamaan (+ 5 °C) vuorokausi ennen niiden käsittelyä.

Ulosteveden eristykseen ulostenäyte laimennettiin Milli Q -vedellä (Millipore, Rios30) 1:1 (ulostenäytettä 10 g ja Milli Q -vettä 10 ml) ja ulostehomogenaatteja varten 1:5 (ulostenäytettä 5 g ja Milli Q -vettä 20 ml). Näytteet punnittiin digitaalivaa’alla muoviputkiin ja laimennettiin

puhdistetulla vedellä. Niitä säilytettiin käsittelyn ajan jäissä. Kaikki näytteet homogenoitiin (IKA ULTRA TURRAX T 18 digital) kaksi minuuttia (13–15 rpm). Ulostehomogenaattia (1:5) kerättiin N-nitrosoyhdisteiden määrittystä varten 2 x 5 ml cryoputkiin (Thermo Scientific) ja näytteet pakastettiin - 70 °C.

Polyfenolianalyyseja varten 1:1-ulosteomogenaattinäytteet sentrifugoitiin, suodatettiin ja lopulta eristetty ulostevesi pakastettiin. Ulostehomogenaattia kerättiin noin 8 ml sentrifugiputkiin (Beckman, Quick-Seal Centrifuge Tubes) ja ne sentrifugoitiin kahden tunnin ajan 4 °C:ssa 30 000 rpm:ssa Optima MAX Ultracentrifugissa (Beckman Coulter). Sentrifugoinnin jälkeen näytteestä eristynyt ulostevesi otettiin putkesta talteen ja putken pohjalle muodostunut pelletti punnittiin. Ulostevesi suodatettiin vielä eri suuruisten suodattimien läpi epäpuhtauksien ja bakteerien poistamiseksi. Isoimpana suodattimena käytettiin 5 µm filteriä ja pienimpänä 0,2 µm filteriä (Life Sciences, GHP Acrodisc 25 mm Syringe Filter). Lopuksi ulostevesi jaettiin kahden millilitran cryoputkiin, mitattiin pH (Accumet AB150 pH/mV, Fisher Scientific) ja pakastettiin - 70 °C.

4.5.3 Ulostenäytteiden analyysit

Ulostehomogenaatista mitattiin suolistossa muodostuvien N-nitrosoyhdisteiden määrä mittaamalla totaali N-nitroso-, N-tioli- ja N-hemiyhdisteiden pitoisuudet. Ulostevedestä analysoitiin tietyt polyfenolimetaboliitit: ferulahappo, protokatekiinihappo (PCA), urolitiini ja 3,4-dihydroksifenyylietikkahappo.

4.5.4 N-nitrosoyhdisteiden mittaaminen

N-nitrosoyhdisteiden mittaauksessa käytettiin ryhmäominaista denitrosaatiomenetelmää. Mittaukset tehtiin NO-analysaattorilla (Exhalyzer CLD88, Eco Medics, Switzerland). Sillä pystyttiin mittaamaan näytteiden totaali N-nitroso-, N-tioli- ja N-hemiyhdisteiden pitoisuudet. NO-analysaattori mittaa typpiyhdisteistä vapautuvan NO-kaasun, joka vapautuu yhdisteistä ns. huuhteluastiassa (engl. purge vessel, katso kuva liitteestä 6) typpiyhdisteitä pelkistävien liuosten avulla. Huuhteluastia on yhdistetty NO-analysaattoriin filterin kautta. Analysaattorin tietokoneohjelma (PowerChrom, eDAQ) piirtää NO-pitoisuudesta piikin, jonka pinta-alan

laskemalla voidaan määrittää yhdisteen pitoisuus vertaamalla pitoisuutta tunnettuun standardiin. Mittauslaitteiston toimivuus testattiin joka mittauspäivän alussa standardisuoralla sekä sisäisellä kontrollinäytteellä, joka oli tehty yhdistämällä neljän eri tutkittavan ulostenäytteet yhteen. Sisäisellä kontrollinäytteellä varmistettiin mittauslaitteiston luotettavuus.

4.5.5 Käytetyt liuokset

Mittausta varten valmistettiin ns. säilytysliuos (SL) yhdistämällä 125 mg N-etyylimaleimidia (NEM, M 125 g/mol) sekä 39 g dietyleenitriamiinipentaetikkahappoa (DTPA, M 393 g/mol) kymmeneen ml:aan HPLC-puhdistettua vettä (engl. High Performance Liquid Chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia). Liuoksen lopulliset konsentraatiot olivat 0,1 M NEM ja 0,01 M DTPA ja se säilyi neljän viikon ajan. Huuhteluastiaa varten valmistettiin trijodidi-liuos, joka vapauttaa NO:n nitriitistä, nitrosotioleista, nitrosoamiineista ja nitrosohemiyhdisteistä. Liuoksessa sekoitettiin 2 g kaliumjodidia (M 166 g/mol), 1,3 g jodidia (M 253,81 g/mol) 40 ml:an HPLC-vettä, jossa oli 140 ml etikkahappoa.

Hapokkaan sulfaniiliamidin (SA, engl. acidic sulphanilamide) avulla saatiin mitattua totaali N-nitrosoyhdisteiden pitoisuus ja liuos valmistettiin joka mittauspäivä. Liuosta varten sekoitettiin 500 mg SA:a kymmeneen ml:an suolahappoa (HCl, engl. Hydrochloric Acid, M 1 g/mol). N-tioliyhdisteiden määrittämiseen valmistettiin elohopeakloridia (HgCl_2 , 10 mM) ja N-hemiyhdisteiden määrittämiseen HgCl_2 -liuosta ja kaliumferrisyaniidi-liuosta ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 nM). Analyyseja varten valmistettiin päivittäin niin kutsuttu standardisuora natriumnitriitistä (NaNO_2) ja HPLC-vedestä siten, että pitoisuudet olivat 20, 40, 60, 80, 100, 200, 350, 500, 650 ja 800 pmol/ μl näytettä.

4.5.6 Näytteiden valmistelu ja mittaus

Kaikki ulostehomogenaattinäytteet käsiteltiin samalla tavalla N-nitrosomittauksia varten. Totaali N-nitroso-, N-tioli- ja N-hemiyhdisteet vaativat eri reagenssiliuokset ja inkubointiajat ennen näytteen ruiskuttamista huuhteluastiaan. Jokainen näyte ja mitattava yhdiste syötettiin laitteistoon erikseen eli yhdeltä koehenkilöltä mitattiin menetelmällä kolme alku- sekä loppunäytettä. Sulatettua ulostehomogenaattia punnittiin määrittystä varten 100 μg , johon sekoitettiin jokaisen yhdisteen kohdalla 100 μl SL:sta inkubointiajan ollen 1 min. Näytettä

pidettiin aina tummissa Eppendorf-putkissa valolta suojattuna jäähauteessa. Totaali NOC:iden määrittämistä varten SL:n lisäksi näytteeseen lisättiin 500 µl SA-liuosta ja inkuboitettiin 4 minuuttia. N-tioliyhdisteiden määrittämistä varten SL:n lisäksi näytteeseen lisättiin ensin SA-liuosta 500 µl (inkubointi 1 min) ja vielä 100 µl HgCl₂-liuosta (inkubointi 3 min). N-hemiyhdisteiden mittausta varten näytteeseen lisättiin SL:n lisäksi 100 µl SA-liuosta (inkubointi 1 min) ja lopuksi HgCl₂- ja (K₃Fe(CN)₆)-liuosta, 100 µl kumpaakin, ja inkuboitettiin 3 minuuttia. Inkubointien jälkeen näytteet ruiskutettiin välittömästi huuhteluastiaan, jokainen näyte erikseen.

Huuhteluastia oli yhdistetty NO-analysointiin. Astiassa käytettiin lämpöhaudetta (60 °C) trijodidi-liuokselle sekä jäädytyshaudetta (4 °C) NaOH-liuokselle (natriumhydroksidi, 1 M). Trijodidi-liuos lisättiin astian vasempaan reaktiokammioon ennen mittauksia ja NaOH oikeaan. Trijodidi-liuos täytyi vaihtaa kolmen näytteen välein. Astiassa kiersi heliumkaasu kantokaasuna ja sen paine säädettiin 0 mmHg. NO-analysointilaitteita laitettiin päälle vuorokausi ennen mittauksia ja sen mittaustarkkuus oli säädetty 1000 ppb (parts per billion) alueelle. Mittaustarkkuus testattiin päivittäin standardisuoralla sekä sisäisellä kontrollinäytteellä ennen tutkimusnäytteiden mittaamista. Ulostehomogenaatinäyte (jossa SL ja reagenssit) ruiskutettiin huuhteluastian kammioon, jossa oli trijodidi-liuos. Astiassa NO lopulta vapautui NO-analysointiin. Analysointilaitteen tietokoneohjelma piirsi mittauksesta piikin ja laski pinta-alasta typpiyhdisteistä vapautuneen NO-pitoisuuden. N-tioliyhdisteiden pitoisuudet laskettiin vähentämällä totaali NOC:istä elohopeakloridille labiilit yhdisteet ja N-hemiyhdisteiden pitoisuudet laskettiin vähentämällä totaali NOC:istä HgCl₂:lle ja K₃Fe(CN)₆:lle labiilit yhdisteet. N-nitrosopitoisuuksissa ei ole huomioitu ulostehomogenaatin 1:5 laimennosta vedellä.

4.6 Polyfenolien ja niiden metaboliittien analysointi

Ulosteviesien polyfenolipitoisuudet määritettiin UHPLC-DAD-FLD (engl. Ultra High Performance Liquid Chromatography Diode Array and Fluorescence Method, erittäin korkean suorituskyvyn kromatografi-diodirividetektorin-fluoresenssi-ilmaisina) -menetelmällä, joka noudatti Kyllin ym. olosuhteita (2011). Polyfenolit analysoi Tuuli Koivumäki Marina Heinosen tutkimusryhmästä Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitokselta.

Polyfenolit ja niiden metaboliitit analysoitiin ulostevedestä sopivina laimennuksina UHPLC-menetelmällä. Injektiotilavuuksina käytettiin pääasiassa 5 ja 10 µl. Näytteiden pitoisuudet määritettiin ulkoisen standardin menetelmällä ja ilmaisimina käytettiin UV-diodirividetektoria sekä fluoresenssi-ilmaisinta. Menetelmässä käytettiin seuraavia polyfenolisia malliaineita ja spektrien aallonpitoisuuksia:

- ferulahappo (kaikki hydroksikanelihapot), OHC 320 nm
- protokatekiinihappo (kaikki hydroksibentsoehapot paitsi 3,4-dihydroksifenyylietikkahappo), OHB 280 nm
- 3,4-dihydroksifenyylietikkahappo (vain itseään varten), OHB 280 nm
- syanidiini-3-glukosidi (kaikki antosyaanit), AS 520 nm

Kaikille polyfenoliryhmien yhdisteille ei ollut omaa yhdistespesifistä standardisuoraa. Kaikki esitetyt polyfenolitulokset ovat µg/ml ulostevettä.

4.7 Aineiston tilastomenetelmät

Tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 22 -tilasto-ohjelmalla (IBM). Ennen tilastollista testausta, aineiston luotettavuutta ja mahdollisia kirjausvirheitä tarkastettiin ääriarvoja ja muuttujien jakaumia tarkastelemalla ja vertaamalla tuloksia AivoDiet-ohjelman ravintoainelaskelmiin. Ravintoainelaskelmissa käytettiin kolmen vuorokauden ruokapäiväkirjojen keskiarvoa tutkimusviikoilta 0 ja 4. Sen lisäksi ruokapäiväkirjoista laskettiin mekaanisesti tutkittavien punaisen lihan ja marjojen keskimääräinen kulutus tutkimuksen lähtö- ja lopputilanteissa.

Aineiston tausta- ja ravintoainemuuttujille laskettiin ohjelmalla perustunnusluvut ja testattiin muuttujien normaalijakautuneisuutta Shapiro-Wilkin -testillä ja kuvaajia tarkastelemalla. Normaalijakautuneisuuden rajana käytettiin testin arvoa <0,05. Ravintoainemuuttujille, jotka eivät olleet normaalisti jakautuneita, tehtiin logaritminmuutos, jotta muuttujien jakauma saatiin normaaliksi. Muuttujien välistä korrelaatiota testattiin Spearmanin kaksisuuntaisella järjestyskorrelaatiolla. Tutkimusaineiston analyysimenetelminä käytettiin riippumattomien ryhmien sekä toisistaan riippuvien otosten parametrisia ja ei-parametrisia testejä, joilla testattiin ryhmien välisiä eroja tutkimuksen lopussa sekä tutkimuksen aikana tapahtunutta muutosta tutkimusryhmissä. Muuttujan ollessa normaalisti jakautunut käytettiin testeinä riippumattomien

ryhmien t-testiä sekä verrannollisten parien t-testiä. Muussa tapauksessa käytettiin ei-parametrisia testejä, Mann-Whitney U -testiä sekä Wilcoxonin merkkitestistä. Normaalisti jakautuneille logaritmuuttetuille ravintoainemuuttujille käytettiin parametrisia testejä tai muussa tapauksessa ei-parametrisia testejä.

Päämuuttujina olivat ulostenäytteistä analysoidut N-nitrosoyhdisteiden ja polyfenolimetaboliittien pitoisuudet sekä ravintoainemuuttujat. N-nitrosomuuttujat olivat totaali N-nitroso-, N-tioli- sekä N-hemiyhdisteiden pitoisuudet tutkimuksen lähtö- ja lopputilanteessa. Polyfenolit ja niiden metaboliitit määritettiin vain tutkimuksen lopputilanteen näytteistä. Polyfenolimuuttujat olivat ferula-, protokatekiini-, 3,4-dihydroksifenyylietikka-, kahvi-, p-kumariini-, sinappi-, homovanilliini- ja vanilliinihappo. Tutkimusryhmien välisiä eroja testattiin tutkimuksen lähtö- ja lopputilanteissa. Sen lisäksi testattiin ryhmän sisäistä muutosta alku- ja lopputilanteissa verrannollisten parien testeillä. Eroa pidettiin tilastollisesti merkitsevänä p-arvon ollessa $< 0,05$. Tulokset on esitetty taulukoissa keskiarvo \pm keskihajonta.

4.8 Eettiset kysymykset ja tietoturva

Tutkimukselle pyydettiin eettinen lausunto Helsingin yliopiston ihmistieteiden eettisen ennakoarvioinnin toimikunnalta. Tutkimusaineistoa käsittelee vain tutkimushenkilökunta ja aineistoa säilytetään turvallisesti yliopiston tiloissa, lukituissa kaapeissa. Tutkimusdata säilytetään tietoteknillisesti suojatussa ympäristössä Helsingin yliopistossa. Tutkittavien henkilötiedot eivät ole näkyvissä aineistossa, eikä niillä ole vaaraa paljastua missään tutkimusvaiheessa. Tutkittavista käytetään aineistossa henkilötietojen sijaan henkilökohtaisia tunnistamiskoodeja.

5 TULOKSET

5.1. Taustamuuttajat

5.1.1 Lähtötilanne

Tutkittavia oli alkujaan 45, mutta kaksi tutkimushenkilöä keskeytti tutkimuksen. Yksi tutkittavista keskeytti tutkimuksen ensimmäisen tutkimusviikon jälkeen tutkimustuotteiden maun vuoksi. Toisen tutkittavan sitoutuminen tutkimukseen oli huono ja hän jätti tulematta viimeisiin mittauksiin, mikä kirjattiin tutkimuksen keskeyttäneeksi. Analyyseihin otettiin mukaan lopulta 43 tutkimushenkilöä (kontrolliryhmä $n = 21$, marjaryhmä $n = 22$), joista naisia oli miehiä enemmän (katso taulukko 3). Kaikki tutkittavat palauttivat ruokapäiväkirjat. Lähtötilanteessa viikolla 0 verinäytettä ei saatu otettua kahdelta marjaryhmäläiseltä ja tutkimusviikolla 4 yhdeltä marjaryhmäläiseltä. Tutkimuksen alkumittauksissa seitsemän tutkittavan hemoglobiinimääritys epäonnistui verinäytteen nopean hyytymisen takia. Verinäytteet jäivät puuttumaan yhdeltä marjaryhmäläiseltä kokonaan sekä toiselta tutkittavalta alkunäytteiden osalta. Ulostenäytteet puuttuivat neljältä tutkittavalta ja yhdeltä tutkittavalta saatiin vain loppunäyte. Syinä tähän oli näytteiden hankala säilytys kotona ja paljon matkustamista vaativa työ.

Taulukossa 3 on tutkittavien taustatietojen vertailua tutkimuksen lähtötilanteessa viikolla 0 ja tutkimuksen lopussa viikolla 4. Tutkittavat olivat keskimäärin 28,6-vuotiaita (20–67-vuotiaita) ja painoindeksiltään normaalipainoisia ($BMI < 25$). Tutkittavien seerumin kolesterolipitoisuus oli keskimäärin $< 5,0$ mmol/l. Lähtötilanteessa tutkimusryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero seerumin LDL-kolesterolipitoisuudessa (p -arvo = 0,006), joka oli marjaryhmässä keskimäärin suurempi kuin kontrollissa. Tutkimuksen alussa vatsaoireista raportoi marjaryhmässä seitsemän tutkittavaa ja kontrolliryhmässä kolme tutkittavaa. Oireet olivat ummetusta, ilmavaivoja ja vatsan turvotusta.

Taulukko 3. Tutkittavien taustamuuttujia tutkimusviikoilla 0 ja 4.

	Kontrolli		Marja		P-arvo ¹
	Vk 0 n = 21	Vk 4 n = 21	Vk 0 n = 22	Vk 4 n = 22	
Nainen n	13 (62 %)		13 (59 %)		
Ikä	29,0 ± 11,5		28,2 ± 9,9		0,951 ⁴
Paino kg	69,9 ± 13,4	70,1 ± 13,2	72,2 ± 13,5	72,1 ± 13,6	0,620 ⁵
BMI	23,3 ± 3,3	23,4 ± 3,3	24,0 ± 37,9	23,9 ± 3,8	0,688 ⁴
Hemoglobiini g/l	141,5 ± 15,1 (n = 19)	140,2 ± 13,5 ² (n = 21)	144,6 ± 14,8 (n = 17)	140,8 ± 11,3 ² (n = 21)	0,822 ⁵
Systolinen verenpaine mmHg	131,5 ± 18,2	127,3 ± 17,2 ³	135,3 ± 37,9	126,5 ± 15,8	0,971 ⁴
Diastolinen verenpaine mmHg	73,1 ± 8,2	73,2 ± 10,5	73,1 ± 8,1	73,0 ± 9,1	0,954 ⁵
Kokonaiskolesteroli mmol/l	4,51 ± 0,92	4,70 ± 0,79 ³	4,93 ± 0,77	4,90 ± 0,88	0,466 ⁴
LDL-kolesteroli mmol/l	2,19 ± 0,68	2,38 ± 0,72 ²	2,81 ± 0,68 ⁶	2,79 ± 0,78	0,122 ⁴
HDL-kolesteroli mmol/l	1,82 ± 0,61	1,88 ± 0,50	1,57 ± 0,45	1,60 ± 0,46	0,058 ⁴
Triglyseridit mmol/l	0,92 ± 0,47	0,86 ± 0,35	0,97 ± 0,53	0,94 ± 0,60	0,744 ⁴

¹Tutkimusryhmien välinen vertailu tutkimusviikolla 4

²Tilastollisesti merkitsevä ero tutkimusryhmän sisällä viikkojen 0 ja 4 välillä, p-arvo < 0,05, kahden riippuvan otoksen t-testi.

³Tilastollisesti merkitsevä ero tutkimusryhmän sisällä viikkojen 0 ja 4 välillä, p-arvo < 0,05, Wilcoxon merkittyjen sijalukujen -testi (Wilcoxon Signed-Rank).

⁴Mann Whitney U -testi

⁵Normaalisti jakautunut muuttuja, riippumattomien otosten t-testi.

⁶Tilastollisesti merkitsevä ero tutkimusryhmien välillä tutkimusviikolla 0, p-arvo < 0,05, Mann Whitney U -testi.

5.1.2 Lopputilanne

Tutkimusjakson lopussa viikolla 4 ei havaittu merkitseviä eroja taustamuuttujissa tutkimusryhmien välillä (katso taulukko 3). Kontrolliryhmässä seerumin HDL-kolesterolipitoisuus oli korkeampi kuin marjaryhmässä, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Tutkittavien paino pysyi keskimäärin samana tutkimuksen ajan. Kun tutkimuksen lopputilannetta verrattiin lähtötilanteeseen tutkimusryhmissä, havaittiin, että veren hemoglobiinipitoisuus pieneni molemmissa ryhmissä (kontrolliryhmä: p-arvo = 0,039, marjaryhmä: p-arvo = 0,033). Kontrolliryhmässä myös systolinen verenpaine laski (p-arvo = 0,04) sekä seerumin kokonais- (p-arvo = 0,046) että LDL-kolesterolipitoisuudet (p-arvo 0,038) suurenivat merkitsevästi. Erot tutkimusryhmien välillä eivät olleet merkitseviä. Tutkimuksen lopussa yhteensä viisi tutkittavaa (kolme marjaryhmäläistä ja kaksi kontrolliryhmäläistä) raportoi vatsaoireista, jotka olivat ummetusta, ripulia ja ilmavaivoja.

5.2 Ruoankäyttö ja ravintoaineiden saanti

5.2.1 Lähtötilanne

Taulukossa 4 on tutkimusryhmien keskimääräinen punaisen lihan sekä marjojen kulutus sekä ravintoaineiden saanti tutkimuksen lähtö- ja lopputilanteissa. Tutkimusryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa punaisen lihan tai marjojen kulutuksessa, eikä energiaravintoaineiden, vitamiinien, kivennäisaineiden tai polyfenolien (myrsetiini ja kversetiini) saanneissa tutkimuksen lähtötilanteessa (katso taulukko 5).

Taulukko 4. Keskimääräinen energiaravintoaineiden saanti sekä punaisen lihan ja marjojen syönti (\pm keskihajonta) tutkimusryhmissä tutkimusviikoilla 0 ja 4

Ravintoaine	Kontrolli n=21		Marja n=22		P-arvo ¹
	Vk 0	Vk 4	Vk 0	Vk 4	
Energia kJ	9060 \pm 2700	8787 \pm 1764	9091 \pm 2357	8838 \pm 2248	0,934 ²
Energia kcal	2164 \pm 645	2100 \pm 421	2172 \pm 563	2110 \pm 537	0,934 ²
Proteiini g	91 \pm 33	99 \pm 36	94 \pm 34	89 \pm 30	0,283 ³
Proteiini E %	17,3 \pm 5,2	19,1 \pm 5,3 ⁵	17,6 \pm 4,1	17,0 \pm 2,9	0,136 ³
Hiilihydraatti g	224 \pm 66	199 \pm 52	214 \pm 58	201 \pm 70	0,888 ²
Hiilihydraatti E %	42,7 \pm 8,2	38,3 \pm 6,2	40,4 \pm 6,2	38,1 \pm 5,0	0,910 ²
Rasva g	89 \pm 40	93 \pm 23	92 \pm 33	95 \pm 22	0,821 ²
Rasva E %	35,6 \pm 8,5	39,4 \pm 6,2	37,1 \pm 6,8	40,2 \pm 5,8 ⁵	0,627 ²
Tyydyttynyt rasva	30,5 \pm 11,4	33,7 \pm 8,6	31,6 \pm 11,1	37,4 \pm 10,5 ⁵	0,221 ³
Tyydyttynyt rasva E %	12,3 \pm 3,0	14,3 \pm 3,0 ⁵	13,0 \pm 3,0	16,0 \pm 3,5 ⁵	0,105 ²
Alkoholi g	5,3 \pm 11	1,4 \pm 3	7,8 \pm 11	3,0 \pm 4	0,401 ⁴
Alkoholi E %	1,7 \pm 2,8	0,5 \pm 1,1	2,1 \pm 2,9	0,9 \pm 1,4	0,385 ⁴
Kuitu g	23,5 \pm 6,9	20,9 \pm 7,2 ⁵	23,4 \pm 9,1	26,9 \pm 9,2 ⁵	0,024 ²
Kuitu E %	2,1 \pm 0,5	1,9 \pm 0,6 ⁵	2,1 \pm 0,6	2,4 \pm 0,6 ⁵	0,006 ²
Veteen liukenematon kuitu g	14,8 \pm 4,5	13,1 \pm 4,4	14,9 \pm 5,5	17,6 \pm 5,8 ⁵	0,004 ³
Sakkarooosi E %	9,0 \pm 4,3	8,0 \pm 3,6	7,8 \pm 2,7	7,1 \pm 3,4	0,386 ²
Fruktoosi E %	3,0 \pm 1,0	2,9 \pm 1,3	3,2 \pm 1,4	3,8 \pm 1,5	0,048 ²
Punainen liha g	80 \pm 87	153 \pm 27 ⁵	104 \pm 62	151 \pm 24 ⁵	0,854 ²
Marjat g	18,6 \pm 30,2	1,5 \pm 4,0 ⁵	32,8 \pm 50,0	191 \pm 23,9 ⁶	< 0,001 ⁴

¹Tutkimusryhmien välisen eron merkitsevyyys vk 4. Ryhmien välillä ei ollut merkitsevää eroa vk 0.

²Normaalisti jakautunut muuttuja, käytetty alkuperäistä muuttujaa, riippumattomien otosten t-testi.

³Muuttujalle tehty Ln-muutos, riippumattomien otosten t-testi

⁴Mann Whitney U -testi

⁵Tilastollisesti merkitsevää ero viikkojen 0 ja 4 välillä tutkimusryhmässä, p-arvo <0,05, Wilcoxon merkittyjen sijalukujen -testi (Wilcoxon Signed-Rank).

⁶Tilastollisesti merkitsevää ero viikkojen 0 ja 4 välillä tutkimusryhmässä, p-arvo <0,001, Wilcoxon merkittyjen sijalukujen -testi (Wilcoxon Signed-Rank).

5.2.2 Lopputilanne

Tutkimuksen lopussa tutkimusviikolla 4 tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä oli marjojen kulutuksessa (p -arvo = $< 0,001$) sekä kuidun ($p = 0,024$), veteen liukenemattoman kuidun ($p = 0,004$) ja fruktoosin ($p = 0,048$) saannissa – marjoja syönneillä tutkittavilla saanti oli keskimäärin suurempaa verrattuna kontrolliryhmäläisiin (katso taulukko 4). Molempien tutkimusryhmien sisällä tapahtui merkitseviä muutoksia energiaravintoaineiden saanneissa. Kontrolliryhmässä lihan kulutus kasvoi ja marjojen syönti väheni, proteiinin ja tyydyttyneen rasvan osuus energiansaannista suureni ja kuidun saanti pieneni verrattaessa tutkimuksen lähtö- ja lopputilanteita. Marjaryhmässä tutkimuksen aikana marjojen ja lihan kulutus suureni, rasvan ja tyydyttyneen rasvan osuus energianlähteenä suureni sekä kuidun ja liukenemattoman kuidun saanti suureni. Marjojen kulutus korreloi merkitsevästi kuidun saannin kanssa (Spearmanin rho, $p = 0,351$, p -arvo = $0,021$) (katso liite 7).

Tutkimuksen lopussa ryhmien välillä oli merkitsevä ero C-vitamiinin (p -arvo = $< 0,001$), seleenin (p -arvo = $0,004$) ja polyfenolien, myrisetiinin (p -arvo = $< 0,001$) ja kversetiinin (p -arvo = $< 0,001$) saannissa (katso taulukko 5). Marjaryhmäläiset saivat näitä keskimäärin enemmän paitsi seleeniä, jonka saanti kontrolliryhmässä oli suurempaa. Ryhmien sisällä tapahtui merkitseviä muutoksia vitamiinien ja kivennäisaineiden saannissa. Molemmissa ryhmissä B₁-vitamiinin saanti suureni tutkimuksen aikana ja marjaryhmässä myös jodin ja C-vitamiinin saanti muuttui merkitsevästi. Myös polyfenolien saannissa tapahtui muutoksia ryhmien sisällä. Kontrolliryhmässä myrisetiinin ja kversetiinin saanti pieneni kun taas marjaryhmässä myrisetiinin saanti suureni merkitsevästi. Myrisetiinin (Spearmanin rho, $p = 0,804$, p -arvo = $< 0,001$), ja kversetiinin saanti ($p = 0,551$, p -arvo = $< 0,001$) korreloi vahvasti marjojen saannin kanssa (katso liite 7).

Taulukko 5 Vitamiinien, kivennäisaineiden ja polyfenolien keskimääräinen saanti ja keskihajonta tutkimusryhmissä viikoilla 0 ja 4.

Yhdiste	Kontrolli n=21		Marja n=22		P-arvo ²
	Vk 0	Vk 4	Vk 0	Vk 4	
A-vitamiini µg	854 ± 499	870 ± 680	910 ± 499	767 ± 517	0,674 ³
D-vitamiini µg	7,4 ± 4,5	8,2 ± 4,2	8,3 ± 4,5	7,5 ± 5,2	0,310 ³
C-vitamiini mg	129 ± 71	131 ± 82	126 ± 75	241 ± 130 ⁶	< 0,001 ³
E-vitamiini mg	12,3 ± 6,5	11,6 ± 4,3	12,6 ± 5,3	12,9 ± 3,8	0,241 ³
B ₁ -vitamiini mg	1,5 ± 0,7	2,2 ± 0,3 ⁵	1,6 ± 0,6	2,1 ± 0,5 ⁶	0,523 ³
B ₂ -vitamiini mg	2,3 ± 1,2	2,1 ± 0,6	2,1 ± 0,8	2,2 ± 1,0	0,963 ³
NE ¹	39,3 ± 17,1	41,2 ± 14,2	39,3 ± 12,7	37,2 ± 10,8	0,353 ³
B ₆ -vitamiini mg	2,7 ± 2,5	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,7	2,4 ± 0,9	0,665 ³
Folaatti µg	303 ± 102	285 ± 110	298 ± 89	316 ± 104	0,292 ³
B ₁₂ -vitamiini µg	6,0 ± 3,8	5,3 ± 2,5	6,0 ± 3,0	5,2 ± 2,9	0,797 ³
Kalsium mg	1071 ± 482	994 ± 361	1217 ± 535	1099 ± 553	0,622 ³
Fosfori mg	1643 ± 573	1633 ± 483	1596 ± 453	1563 ± 589	0,487 ³
Kalium g	4,1 ± 1,5	3,9 ± 1,2	4,0 ± 1,1	4,0 ± 1,2	0,874 ³
Rauta mg	13,1 ± 4,2	12,0 ± 2,9	14,0 ± 5,7	12,7 ± 4,3	0,735 ³
Jodi µg	216 ± 71	206 ± 120	278 ± 237	173 ± 70 ⁵	0,253 ³
Seleeni µg	93 ± 55	102 ± 56	84 ± 37,1	69 ± 19,5	0,004 ³
Myrisetiini µg	517 ± 298	242 ± 176 ⁵	796 ± 894	3262 ± 1810 ⁶	< 0,001 ⁴
Kversetiini µg	7343 ± 4378	4930 ± 3053 ⁵	8365 ± 6321	9232 ± 4525	< 0,001 ⁴

¹NE=Niasiiniekvivalentti = 1 mg niasiinia

²Ryhmien välisen eron merkitsevyys vk 4. Ryhmien välillä ei ollut merkitsevää eroa vk 0.

³Muuttujalle tehty Ln-muutos, riippumattomien otosten t-testi

⁴Mann Whitneyn U -testi

⁵Tilastollisesti merkitsevä ero viikkojen 0 ja 4 välillä tutkimusryhmässä, p-arvo <0,05, Wilcoxon merkittyjen sijalukujen -testi (Wilcoxon Signed-Rank).

⁶Tilastollisesti merkitsevä ero viikkojen 0 ja 4 välillä tutkimusryhmässä, p-arvo <0,001, Wilcoxon merkittyjen sijalukujen -testi (Wilcoxon Signed-Rank).

5.3 N-nitrosoyhdisteet

Taulukossa 6 on tutkimuksen lähtö- ja lopputilanteen ulosteen N-nitrosoyhdisteiden pitoisuudet tutkimusryhmissä. Vertailutulokset on esitetty myös kuvaajina (katso kuva 3). Lähtötilanteessa totaali N-nitroso-, N-tioli- ja N-hemiyhdisteiden pitoisuudet olivat korkeampia marjaryhmässä verrattuna kontrolliryhmään, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Tutkimusviikolla neljä marjaryhmässä pitoisuudet olivat kontrolliryhmää pienemmät, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Tutkimusryhmien sisällä N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksissa ei tapahtunut tilastollisesti merkitseviä eroja tutkimuksen aikana. Kaikkien N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksien keskihajonta oli pienempi lopputilanteessa verrattuna lähtötilanteeseen. N-

nitrosoyhdisteiden pitoisuuksien välinen korrelaatio oli vahvaa niin tutkimuksen alussa kuin lopussa (Spearmanin rho, $p = 0,371-0,983$, p-arvot pääasiassa $<0,001$) (katso liite 8). Liitteissä 8–10 on esitetty myös muiden muuttujien korrelaatiotuloksia ja -kuvaajia N-nitrosoyhdisteiden suhteen. N-hemiyhdisteiden pitoisuus korreloi merkitsevästi kuidun ($p = -0,336$, p-arvo = $0,037$) sekä kversetiinin saannin kanssa tutkimusviikolla 4 ($p = -0,416$, p-arvo = $0,008$) (katso liitteet 9–10).

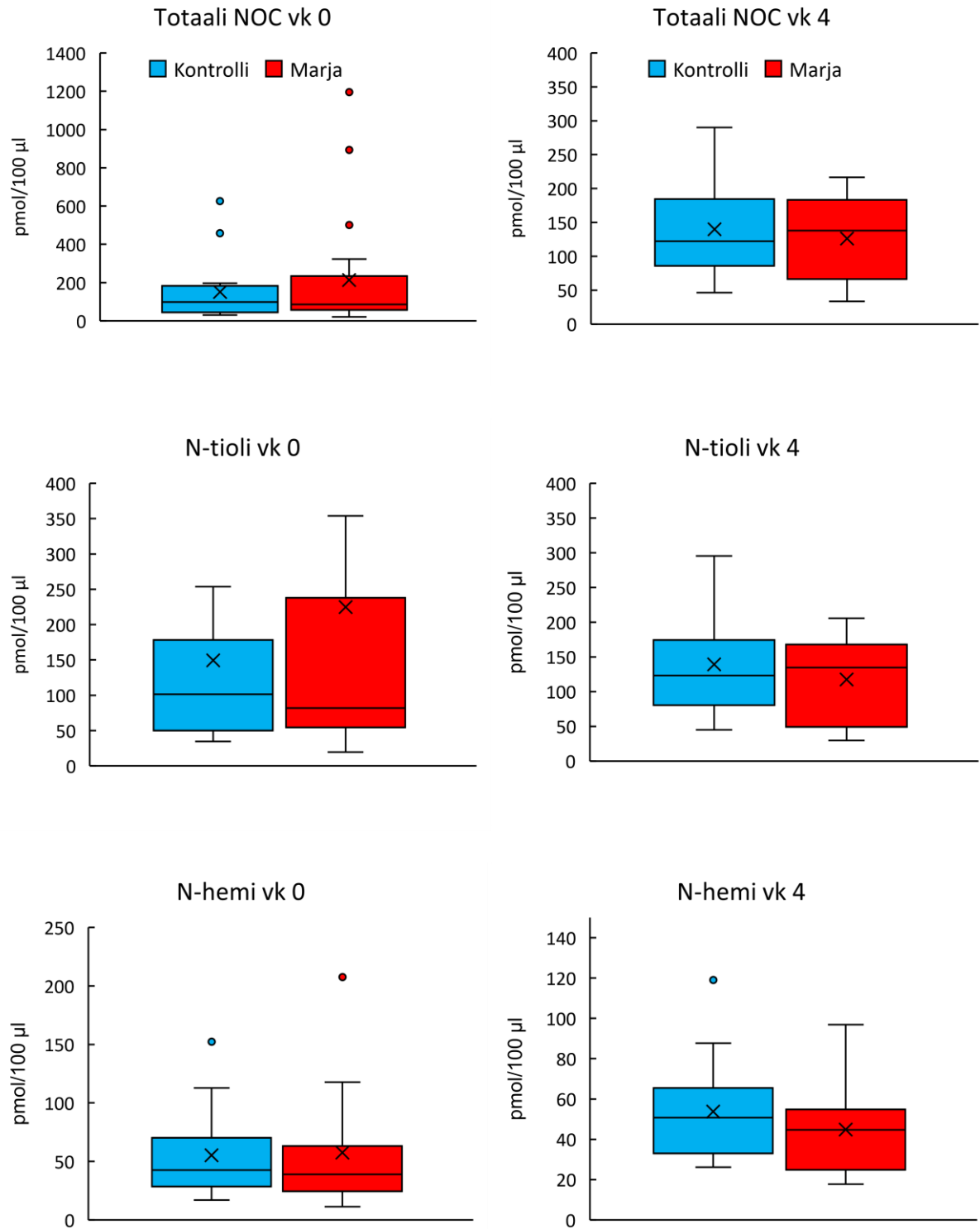
Taulukko 6. N-nitrosoyhdisteiden keskimääräinen pitoisuus (pmol/100 µl ulostehomogenaattia) ulosteessa tutkimusryhmissä tutkimusviikoilla 0 ja 4

Yhdiste ¹	Kontrolli		Marja		P-arvo ²	P-arvo ³
	Vk 0 n=17	Vk 4 n=18	Vk 0 n=21	Vk 4 n=21		
Totaali NOC	151,6 ± 160,6	140,0 ± 68,6	213,4 ± 303,2	126,3 ± 63,6	0,839	0,522
N-tioli	149,6 ± 152,2	139,3 ± 71,8	224,7 ± 335,5	117,5 ± 59,3	0,977	0,306
N-hemi	55,2 ± 37,7	53,7 ± 24,4	57,5 ± 56,0	44,9 ± 22,5	0,750	0,246

¹Pitoisuus pmol/100 µl ulostehomogenaattia. Pitoisuuksissa ei ole huomioitu 1:5 laimennosta vedellä.

²Mann-Whitney U -testi, ryhmien välinen vertailu

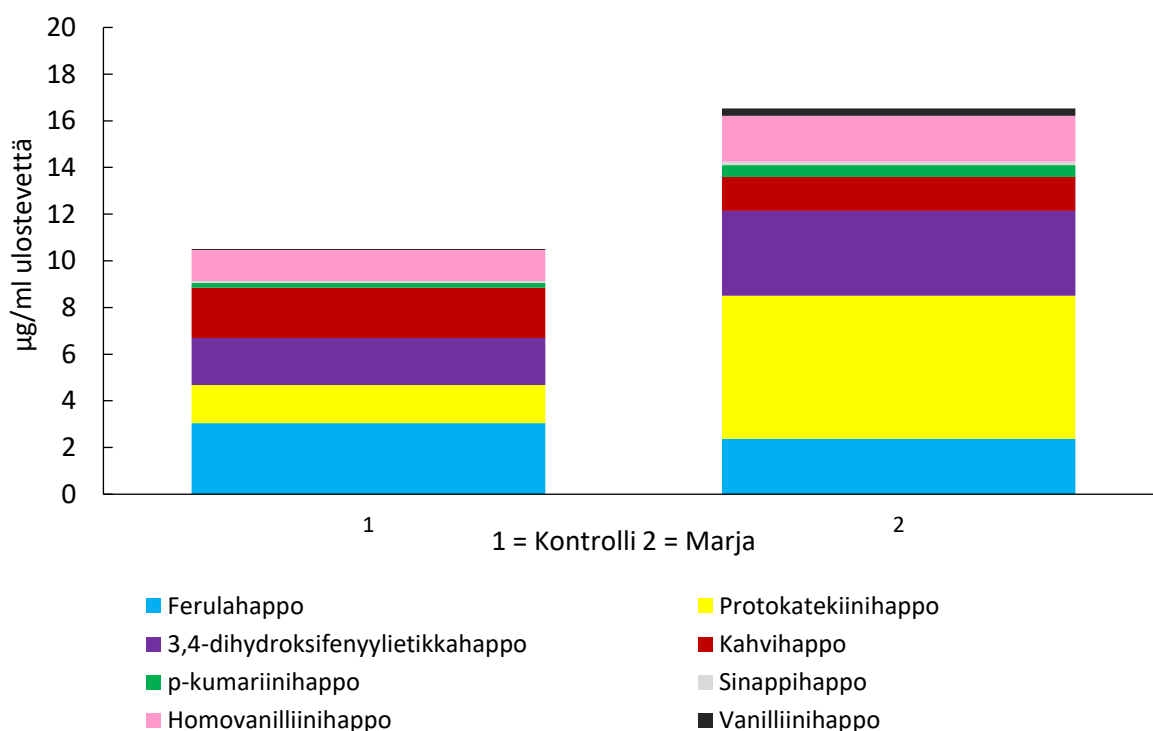
³Riippumattomien otosten t-testi, muuttujat normaalisti jakautuneita, ryhmien välinen vertailu



Kuva 3. Tutkimusryhmien totaali N-nitroso-, N-tioli- ja N-hemiyhdisteiden pitoisuudet (pmol/100 µl ulostehomogenaattia) tutkimusviikoilla 0 ja 4. Kuvaajissa sinisellä on kuvattu kontrolliryhmä ja punaisella marjaryhmä. Huomioi erisuuruiset asteikot Y-akselilla.

5.4 Polyfenolit ja niiden metaboliitit

Polyfenolit ja niiden metaboliitit analysoitiin tutkimushenkilöiden loppunäytteistä (vk 4) eristetyistä ulostevesistä. Ulostevesinäytteistä määritettiin ennakkoon sovitut polyfenolimetaoliitit: ferulahappo, protokatekiinihappo ja 3,4-dihydroksifenyylietikkahappo. Antosyaaneja tai urolitiiniä ei näytteistä havaittu. Muut tunnistetut polyfenolit olivat kahvihappo, p-kumariinihappo, sinappihappo, homovanilliinihappo ja vanilliinihappo. Kaikki esitetyt tulokset ovat $\mu\text{g/ml}$ ulosteveettä ja niissä on huomioitu suodatusvaiheessa tehty 1:2 (tai 1:3) laimennos. Kuvassa 4 on esitetty polyfenolien keskimääräiset pitoisuudet tutkimusryhmissä.



Kuva 4. Polyfenolien keskimääräiset pitoisuudet tutkimusryhmissä tutkimusviikolla 4.

Taulukossa 7 on ulostevesinäytteiden polyfenolien pitoisuudet tutkimusryhmissä intervention loppupisteessä. Marjaryhmässä ulosteveden protokatekiinihapon (p-arvo = 0,027) ja p-kumariinihapon (p-arvo = 0,003) pitoisuudet olivat keskimäärin suurempia kuin kontrolliryhmässä. Kuvaajissa on esitetty ferulahapon, protokatekiinihapon ja p-kumariinihapon pitoisuuksien jakaumat tutkimusryhmissä (katso kuva 5). Muiden polyfenolien

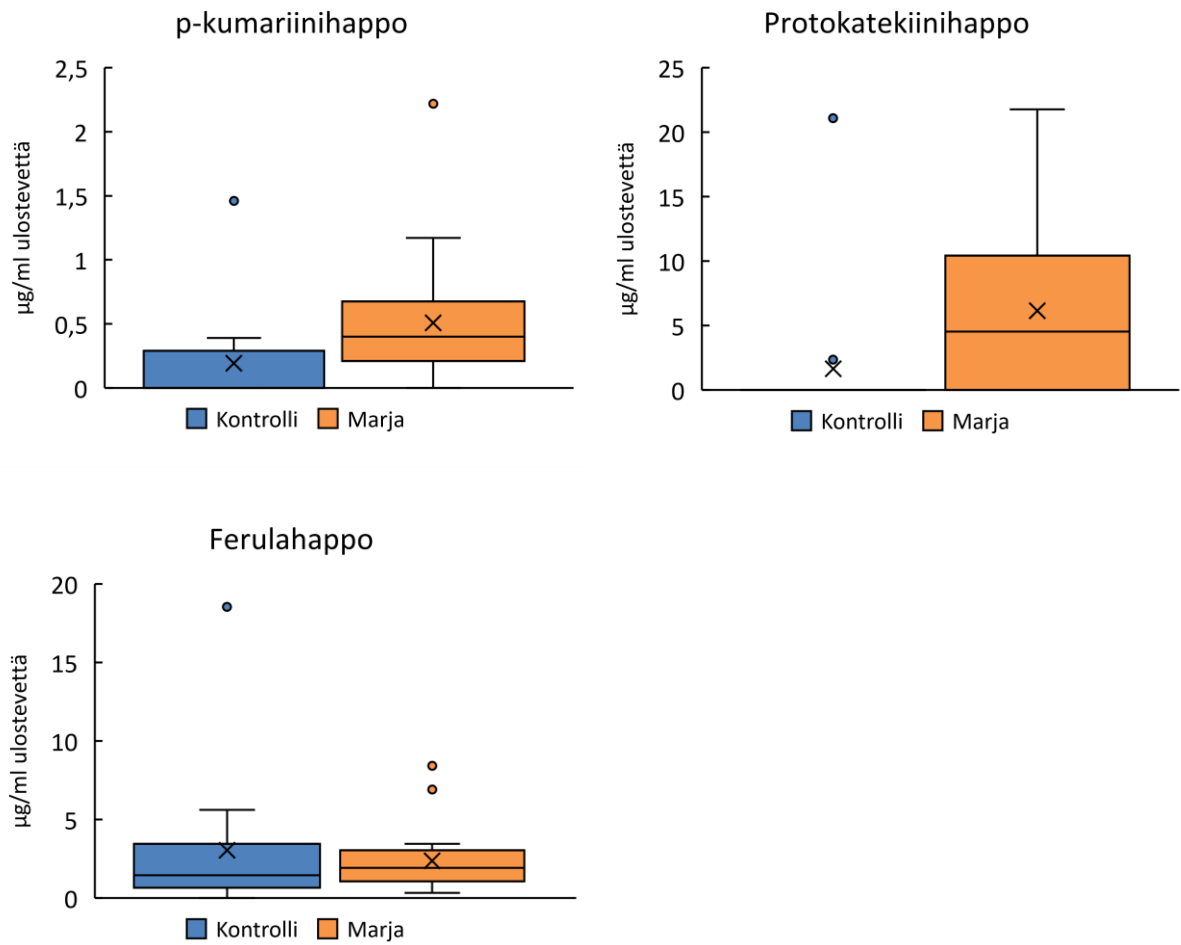
jakaumat löytyvät liitteestä 11. Protokatekiini- (Spearmanin rho, $p = 0,357$, p-arvo = 0,030) ja p-kumariinihapon ($p = 0,356$, p-arvo = 0,031) pitoisuudet korreloivat merkitsevästi marjojen syönnin kanssa (katso liite 7). Polyfenolien korrelaatioita on esitetty liitteissä 7, 9 ja 10.

Taulukko 7. Polyfenolien keskimääräinen pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$ ulostevedettä) ulostevedessä tutkimusryhmissä tutkimusviikolla 4.

Polyfenoli ¹	Kontrolli n=16	Marja n=21	P-arvo ²
Polyfenolit yhteensä	10,4 ± 11,7	16,5 ± 11,7	0,083
Ferulahappo	3,04 ± 4,48	2,37 ± 2,00	0,683
Protokatekiinihappo	1,64 ± 5,26	6,14 ± 7,44	0,027
3,4-Dihydroksifenyylietikkahappo	2,02 ± 5,09	3,63 ± 6,87	0,495
Kahvihappo	2,14 ± 5,95	1,46 ± 3,76	0,138
p-kumariinihappo	0,20 ± 0,36	0,51 ± 0,49	0,003
Sinappihappo	0,09 ± 0,19	0,14 ± 0,37	0,868
Homovanilliinihappo	1,32 ± 2,13	1,97 ± 2,49	0,596
Vanilliinihappo	0,04 ± 0,12	0,32 ± 0,56	0,241

¹Kaikki pitoisuudet $\mu\text{g/ml}$ ulostevedettä

²Mann-Whitney U -testi, ryhmien välinen ero



Kuva 5. p-kumariini-, protokatekiini-, ja ferulahappojen pitoisuuksien ($\mu\text{l/ml}$ ulosteveettä) jakauma kontrolli- (sininen) ja marjaryhmissä (oranssi) tutkimusviikolla 4. Huomioi erisuuruiset Y-asteikot.

6 POHDINTA

6.1 NOC, punainen liha ja marjat

Marjojen vaikutusta N-nitrosoyhdisteiden sisäsyntyiseen muodostukseen ei ole tiettävästi aiemmin tutkittu. Terveillä, tupakoimattomilla, keskimäärin normaalipainoisilla aikuisilla toteutetun KarniMari-tutkimuksen mukaan neljän viikon kestävä päivittäinen marjojen syönte ei vaikuta merkittävästi ulostenäytteestä mitattujen N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksiin sianlihaa sisältävällä ruokavaliolla, vaikka marjoja syöneillä pitoisuudet olivat keskimäärin pienempiä kontrolliryhmäläisiin nähden. Tutkimuksen aikana tutkittavat söivät punaista lihaa keskimäärin jopa 60 g/d enemmän verrattuna lähtötilanteeseen, mutta kummassakaan ryhmässä tämä ei näkynyt merkittävänä N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuden suurenemisena, mitä olisi voinut olettaa aiempien tutkimusten perusteella (Hughes ym. 2001). Tosin kaikissa interventiotutkimuksissa punaisen lihan syöminen ei ole vaikuttanut ulosteen NOC-pitoisuuteen (Hebels ym. 2012). Hebelsin ym. tutkimuksessa tutkittavat sairastivat tulehduksellista suolistosairautta.

Tulosten N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksia on vaikea verrata aiempien punaista lihaa sisältävien interventiotutkimusten tuloksiin, sillä tutkimukset on tehty erilaisilla koeasetelmilla, tulokset on esitetty vaihtelevin tavoin, eikä marjojen vaikutusta ole aikaisemmin tutkittu (Hughes ym. 2001, Kuhnle ym. 2007, Joosen ym. 2009). Aiemmissä NOC:itä tutkineissa tutkimuksissa on havaittu ulosteen NOC-pitoisuuden hajonnan suurenevan moninkertaisesti punaisen lihan määrän kasvaessa (Hughes ym. 2001, Bingham ym. 2002). Tässä tutkimuksessa hajonnassa tapahtui päinvastoin verrattaessa lähtö- ja lopputilanteita – NOC:iden pitoisuuksien hajonnat pääasiassa puolittuivat. Se tapahtui niin totaali N-nitroso- kuin N-tioli- ja N-hemiyhdisteiden kohdalla. Silti verrattuna aiempiin tutkimuksiin, mitattiin tässä tutkimuksessa NOC:iden pitoisuuksissa keskimäärin suurempi hajonta (Kuhnle ym. 2007, Joosen ym. 2009). Sitä voi selittää esimerkiksi se, että aiemmissä tutkimuksissa tutkimusruokavaliot ovat olleet tarkoin kontrolloidut ja tutkittavat ovat olleet miehiä, kun tässä tutkimuksessa ruokavalio oli melko vapaa ja tutkittavat olivat sekä miehiä että naisia.

Punaista lihaa sisältävissä interventiotutkimuksissa (Kuhnle ym. 2007 ja Joosen ym. 2009), joissa totaali NOC:istä eroteltiin N-tioli- ja N-hemiyhdisteet, on N-hemiyhdisteiden pitoisuus

ollut suurempaa kuin N-tioliyhdisteiden. Se on päinvastoin verrattuna tämän tutkimuksen tuloksiin, joissa N-tioliyhdisteiden pitoisuus on N-hemiyhdisteiden pitoisuutta suurempi. Eroa voi mahdollisesti selittää tutkimuksissa käytetty liha, mikä aiemmissa tutkimuksissa on ollut sekä naudan- että sianlihaa. Väestötutkimusten mukaan naudanliha saattaa olla suolistolle sianlihaa haitallisempaa (Carr ym. 2016). Naudanliha sisältää enemmän hemirautaa kuin sianliha, mikä voi vaikuttaa hemirautayhdisteiden pitoisuuteen (Kuhnle ym. 2007). Mahdollisesti nauhanlihaa syömällä N-hemiyhdisteiden pitoisuus olisi voinut olla korkeampi tässä tutkimuksessa naudanlihan suuremman hemirautapitoisuuden takia verrattuna sianlihaan. Tutkijat arvelevat hemin olevan N-hemiyhdisteiden lähtöaine (Bastide ym. 2015). Rotilla tehdyssä kokeessa havaittiin, että hemirautaa sisältävällä ruokavaliolla NOC:itä muodostui pääasiassa N-hemiyhdisteistä, kun taas natriumnitriittiä sisältävällä ruokavaliolla N-hemiyhdisteiden pitoisuus oli pienempää ja NOC:itä muodostui pääasiassa muista NOC:istä kuin N-hemiyhdisteistä ulostevedestä mitattuna. Hemirautaa sisältävä ruokavalio lisäsi MDF-kasvainten määrää paksusuolella verrattuna natriumnitriittiä sisältävään ruokavalioon, vaikka molemmat lisäsivät NOC-pitoisuutta ulosteessa kontrolliryhmään verrattuna (Bastide ym. 2015). On mahdollista, että KarniMari-tutkimuksessa ruokavaliot sisälsivät melko vähän hemirautaa, minkä takia N-hemiyhdisteiden pitoisuus oli pienempi verrattuna N-tioliyhdisteiden pitoisuuteen. Tutkimusruokavaliolla tutkittavien raudan saanti hieman pieneni, mikä tosin ei ollut tilastollisesti merkitsevä muutos tutkimusryhmissä. Se voisi mahdollisesti osittain selittää N-hemiyhdisteiden pitoisuuksien alenemista tutkimusryhmissä. Ruokavaliion hemiraudan saantia ei tutkimuksessa kuitenkaan pystytty mittaamaan, eikä tutkimuslihan hemirautapitoisuutta mitattu.

KarniMari-tutkimuksessa lihan määrä saattoi olla liian pieni, jotta kyettiin havaitsemaan eroa N-nitrosoyhdisteiden muodostuksessa. Punaisen lihan syönti ei tutkimuksessa, niin alussa kuin lopussa, korreloinut N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksien kanssa (katso liite 8). Pienellä lihan määrällä (60 g/d) ei ole havaittu merkitsevää eroa NOC-pitoisuuteen verrattuna ei-punaista lihaa sisältävään ruokavalioon (Hughes 2001). Tutkimustietoa ei ole, kuinka noin 70–200 g/d punaista lihaa vaikuttaa ulosteen NOC-pitoisuuteen. Tutkimuksen lähtötilanteessa tukittavat söivät punaista ja prosessoitua lihaa noin 20 g/d vähemmän kuin suomalaiset keskimäärin (Helldán ym. 2013) ja toisaalta marjoja hieman enemmän, mikä viittaa tutkittavien keskimääräistä terveellisimpiin syömistottumuksiin. Tutkimuksessa käytetty lihan määrä (150 g/d) on lähes saman verran kuin keskiverto suomalainen mies syö punaista lihaa (Helldán ym.

2013). Määrä on kuitenkin huomattavasti vähemmän kuin monessa aiemmassa NOC-tutkimuksessa (240–600 g/d, Hughes ym. 2001). Punaisen lihan ja marjojen määrät tutkimusruokavaliossa olivat pääasiassa hyvin siedettyjä tutkittavien oireiden raportoinnin mukaan. Verrattaessa tutkimuksen lähtö- ja lopputilannetta väheni vatsaoireiden määrä erityisesti marjaryhmäläisillä. Toisaalta kolme tutkittavaa, joilla oireita ei ollut tutkimuksen alussa, raportoi niistä tutkimuksen lopussa. Kahdella tutkittavalla oireet edelleen jatkuivat tutkimuksen lopussa.

6.2 Marjat ja polyfenolimetaboliitit

Tässä tutkimuksessa ulostevedestä mitattiin useita polyfenolimetaboliitteja, joista suurimmat pitoisuudet olivat ferula-, protokatekiini- ja 3,4-dihydroksifenyylitikkahappojen pitoisuuksissa. Ryhmien välillä merkitsevät erot havaittiin protokatekiini- ja p-kumariinihappojen pitoisuuksissa niiden ollessa marjaryhmässä merkitsevästi suuremmat kuin kontrolliryhmässä. Kaikkia suunniteltuja polyfenoleja ei pystytty mittaamaan, kuten antosyaaneja ja urolitiinia, joka oli uusi yhdiste myös tutkimusryhmälle. On mahdollista, että antosyaanit olivat jo metaboloituneet muiksi fenolihapoiksi. Urolitiinia kaikki yksilöt eivät luultavasti tuota suolistossaan (Cerdá ym. 2005, Truchado ym. 2012). Ferulahappo erottui kaikista näytteistä hyvin, minkä takia sen pitoisuutta voidaan pitää luotettavana. Protokatekiinihapon pitoisuuteen liittyy epävarmuutta, sillä yhdiste eluoitui kromatogrammien ”ruuhka-alueella”, minkä takia näytteet olisi haluttu alun perin puhdistaa mikrokiinteäfaasiuuttosysteemillä (μ SPE, engl. micro Solid-Phase Extraction). Tällä menetelmällä saannot kaikista halutuista näytteistä eivät kuitenkaan olleet erinomaisia, minkä takia mittauksessa päädyttiin suorainjektointiin UHPLC:lle.

Punaisen lihan syöminen ei tutkimuksessa korreloinut polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien kanssa. Marjojen syönnillä ei myöskään havaittu merkitsevää korrelaatiota N-nitrosoyhdisteiden kanssa. Sen sijaan polyfenolin, kversetiinin, saanti korreloi käänteisesti N-hemiyhdisteiden pitoisuuden kanssa (katso liite 10). Marjojen tai niiden sisältämien polyfenolien tai polyfenolimetaboliittien vaikutusta NOC muodostukseen ei ole tutkittu aiemmin punaista lihaa sisältävissä interventiotutkimuksissa, eikä mahdollinen vaikutusmekanismi ole selvä. Polyfenolimetaboliitit saattavat esimerkiksi sitoutua suolistossa NOC:isiin muodostaen suolistoa suojaavia yhdisteitä (Lee ym. 2005). Polyfenolit ja niiden

metaboliitit voivat vaikuttaa paksusuolisyövän kehittymiseen myös muuta kuin mahdollisen NOC-muodostuksen inhiboinnin kautta. Esimerkiksi p-kumariini- ja ferulahapon on havaittu *in vitro* -tutkimuksessa inhiboivan paksusuolisyöpäsolujen jakaantumista, ja p-kumariinihapo luultavasti vaikuttaa mitokondriaalisen oksidatiivisen stressin ja lipidien peroksidaation kautta (Janicke ym. 2011). p-kumariinihapolla, kuten monilla muillakin polyfenoleilla, on havaittu antioksidanttisia vaikutuksia ja voivat siten estää reaktiivisten happiradikaalien vahingollisia vaikutuksia suolistossa (Janicke ym. 2011).

Polyfenolien lisäksi marjat sisältävät paljon myös muita yhdisteitä, kuten C-vitamiinia ja kuitua, joiden on havaittu olevan yhteydessä NOC:iden muodostukseen ihmisillä (Holtrop ym. 2012). Marjaryhmäläiset saivat tutkimusruokavaliolla enemmän kuitua sekä C-vitamiinia kuin kontrolliryhmäläiset. Kuidun saanti korreloi tutkimuksessa marjojen syönnin kanssa (katso liitteet 7 ja 9). Rungas kuidun saanti voi lyhentää suolen tyhjenemisaikaa, jolloin N-nitrosoyhdisteitä mahdollisesti muodostuu suolistossa vähemmän (Hughes ym. 2002). Siten ruoan hidaskulku-aika voi olla suoletta haitallista. Tässä tutkimuksessa ei mitattu aikaa, jonka ruoka viipyy tutkittavien suolistossa. Koska kuidun saanti oli marjaryhmässä suurempaa, oletettavasti myös suolen läpikulku-aika oli heillä kontrolliryhmää nopeampaa, jolloin myös NOC:iden pitoisuus olisi voinut olla pienempää. *In vivo* -tutkimuksessa on havaittu polyfenolien ja C-vitamiinin yhdessä estävän N-nitrosoyhdisteiden genotoksisia vaikutuksia eläinmallissa, mutta tutkimuksessa ei mitattu sisäsyntyisten NOC:iden muodostusta (Abraham ym. 2013). EPIC-kohorttitutkimuksessa havaittiin, että N-nitrosoyhdisteen suurempi saanti oli yhteydessä suurentuneeseen syöpäriskiin henkilöillä, joiden plasman C-vitamiinipitoisuus oli alhainen (Loh ym. 2011). Russelin ym. (2011) tutkimuksessa havaittiin, että painonhallintaruokavaliolla hiilihydraattien ja kuidun vähentäminen ruokavaliosta lisäsi merkittävästi NOC-pitoisuutta koehenkilöillä. Tutkimustuloksista ei tosin voida poistaa rasvojen saannin vaikutusta NOC:iden pitoisuuteen.

Kuidun tai polyfenolien saannin käänteistä yhteyttä NOC-muodostukseen eivät puolla tutkimukset, joissa on nautittu punaisen lihan ohella vihreitä kasviksia, tee-uutetta tai resistenssiä tärkkelystä (Hughes ym. 2002, Silvester ym. 1997). Hughesin ym. (2002) tutkimuksessa sen sijaan havaittiin, että 100 g soijapapuja päivässä pienentää NOC-pitoisuutta tutkittavilla, jotka olivat punaista lihaa sisältävällä ruokavaliolla. Soija sisältää polyfenoleista

erityisesti isoflavonia nimeltään genisteiini, jonka on solukokeissa havaittu estävän N-nitrosoatiota. Tutkimuksessa ei voida poissulkea soijan sisältämien muiden yhdisteiden vaikutuksia NOC-muodostukseen. Tutkimuksessa NOC-pitoisuus korreloi vahvasti ei-tärkkelyspitoisten polysakkaridien ja proteiinin saannin kanssa (Hughes ym. 2002). Tässä tutkimuksessa N-hemiyhdisteiden pitoisuus korreloi käänteisesti kuidun saannin kanssa tutkimusviikolla 4 (katso liitteet 9 ja 10). Kuidun saanti ei korreloinut merkittävästi muiden N-nitrosoyhdisteiden kanssa. N-nitrosoyhdisteillä havaittiin merkittäviä korrelaatioita eräiden muiden ravintoaineiden kanssa (katso liitteet 9 ja 10). N-nitrosoyhdisteiden yhteys eri ravintoaineisiin viittaa siihen, että ruokavalion monet komponentit saattavat vaikuttaa N-nitrosoyhdisteiden muodostukseen – ei pelkästään punaisen lihan määrä.

6.2.1 Polyfenolimetaboliitit

Gillin ym. (2010) mukaan protokatekiinihappo on pääasiassa polyfenolien aineenvaihduntatuote ja sitä voidaan mahdollisesti pitää antosyaanien saannin biomarkkerina. Gillin ym. (2010) tutkimuksessa vadelmapyreen syönte sai aikaan yli puolella tutkittavista (n=10) protokatekiinihappopitoisuuden suurenemisen ulosteessa. Marjat sisältävät myös pieniä määriä p-kumariini- ja protokatekiinihappoja, mutta useimmissa hedelmissä näitä ei havaita (Mattila ym. 2006). Näiden polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien eroa tutkimusryhmien välillä tässä tutkimuksessa voi hyvin selittää marjojen syönte ja pitoisuudet korreloivatkin merkittävästi marjojen syöntein kanssa (katso liitteet 7 ja 9). Toisaalta edes marjaryhmässä läheskään kaikkien tutkittavien näytteistä ei näitä polyfenolimetaboliitteja löydetty. Marjaryhmässä PCA:ta ei havaittu yhdeksällä ja p-kumariinihappoa kahdella, kun vastaavia polyfenoleja ei kontrolliryhmässä havaittu 13:a ja kahdeksalla. Myöskään Gillin ym. (2010) tutkimuksessa minkään mitatun polyfenolimetaboliitin pitoisuus ei suurentunut merkittävästi kaikilla tutkittavilla ja pitoisuudet vaihtelivat paljon tutkittavien välillä. Protokatekiinihapon pitoisuudet olivat huomattavasti pienempiä kuin tässä tutkimuksessa marjaryhmäläisillä. Gillin ym. (2010) eivät heikään pystyneet mittaamaan urolitiinia, vaikka suoliston mikrobit hajottavat ellagitanniinia – yhtä vadelman pääpolyfenolia – urolitiiniksi.

Suomessa kahvihapon saanti on suurempaa kuin ferulahapon (Ovaskainen ym. 2008). Tässä tutkimuksessa ei pystytty mittaamaan muiden polyfenolien kuin kversetiinin ja myrisetiinin saanti johtuen ravintoainelaskentaohjelman käyttämän tietokannan puutteista. Ulostevedestä mitattuna ferulahapon pitoisuus oli tässä tutkimuksessa suurempaa kuin kahvihapon. Tätä voisi

selittää esimerkiksi tutkittavien vähäisempi kahvin juonti verrattuna keskimääräiseen suomalaiseen käyttöön. Kahvi sisältää runsaasti kahvihappoa (Ovaskainen ym. 2008), mutta tutkimuksessa ei ollut käytössä aineistoa ruoka-aineiden kulutusmääristä. Myös marjat sisältävät kahvihappoa. p-kumariinihappo on monien hydroksikanelihappojen, kuten ferula-, sinappi-, vanilliini- ja kahvihapon lähtöaine (El-Seedi ym. 2012), mutta sen pitoisuus korreloi merkitsevästi vain kahvihapon kanssa (katso liitteet 7 ja 9).

Muista polyfenolimetaboliiteista poiketen ferulahapon pitoisuus oli suurempi kontrolliryhmässä kuin marjaryhmässä, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Ferulahappoa sisältävät runsaasti muun muassa täysjyväviljatuotteet ja sitrushedelmät, mutta marjoissa pitoisuus on keskimäärin edellä mainittuja huomattavasti pienempi (Mattila ym. 2006, El-Seedi ym. 2012). On mahdollista, että kontrolliryhmäläiset söivät ferulahapon lähteitä enemmän esimerkiksi korvaamaan ruokavalion marjoja. Ferula- ja sinappihapon välillä havaittiin merkitsevä korrelaatio (katso liitteet 7 ja 9), mitä voi selittää se, että ferulahappo voi muuntua suolistossa sinappihapoksi (El-Seedi ym. 2012). Toisaalta myös kahvihappo voi muuntua ferulahapoksi, mikä voisi myös selittää ferulahapon suurempaa pitoisuutta, mutta pitoisuuksien välillä ei havaittu merkitsevää korrelaatiota. Polyfenolimetaboliittien pitoisuudet mitattiin vain tutkimuksen loppunäytteistä, minkä takia ei tiedetä, miten niiden pitoisuudet muuttuivat tutkittavilla tutkimuksen aikana. Tämä on myös yksi tutkimuksen puutteista. Polyfenolien biologiseen aktiivisuuteen vaikuttaa hyvin moni asia, kuten ruoan muut komponentit sekä ruoan pureskelu. Marjat tarjottiin tutkittaville kokonaisina ja he saattoivat nauttia niitä hyvin eri tavoin. Tällä on voinut olla vaikutus niiden imeytymiseen ja toisaalta eritykseen.

Eräässä pienessä tutkimuksessa (n=5) havaittiin, että ulostevedestä mitattujen polyfenolien pitoisuudet vaihtelivat paljon vuorokaudesta toiseen (Jenner ym. 2005). Protokatekiini-, kahvi-, 3,4-dihydroksifenyylietikka-, ferula-, vanilliini ja p-kumariinihappojen pitoisuudet vaihtelivat yksittäisellä tutkittavalla moninkertaisesti päivästä riippuen (Jenner ym. 2005). Suuri päivittäinen vaihtelu ulosteen polyfenolipitoisuuksissa on voinut vaikuttaa myös tämän tutkimuksen tuloksiin. Marjaryhmäläiset söivät viikossa kuutta eri marjaa, joista mustikoita eniten. Luultavasti monet eivät syöneet läheskään kaikkia marjoja kaikkina päivinä, jolloin tiettyjen polyfenolimetaboliittien pitoisuudet voivat vaihdella huomattavasti päivästä toiseen riippuen syödyistä marjoista. Tämä luultavasti lisäsi tutkittavien välistä vaihtelua

polyfenolipitoisuuksissa. Niin marja- kuin kontrolliryhmässä oli paljon tutkittavia, joilla monen polyfenolimetaboliitin pitoisuus oli nolla. Päivien välistä vaihtelua olisi voinut pienentää esimerkiksi marjojen jakaminen sekoituksena, mikä tosin olisi voinut vaikuttaa marjojen syöntihalukkuuteen, tai ulostenäytteiden kerääminen useammalta kuin kahdelta vuorokaudelta. Tarkkaa tietoa ei tosin ole siitä, kuinka kauan polyfenolit ja niiden metaboliitit säilyvät suolistossa.

6.3 Suolistomikrobien vaikutus

N-nitroyhdisteiden ja polyfenolimetaboliittien pitoisuuksissa on paljon henkilöiden välistä vaihtelua, mitä voi selittää suoliston erilainen mikrobisto, joka osallistuu suolistometaboliittien muodostukseen. Tutkimustietoa tiettyjen suolistomikrobien yhteydestä NOC-muodostukseen ei ole. KarniMari-tutkimusjakson pituus oli neljä viikkoa, mikä ajallisesti voisi olla riittävä mikrobimuutoksille. N-nitrosoyhdisteiden yhteyttä suolistomikrobeihin voitaisi tutkimusaineistosta edelleen tutkia. Eräässä vaihtovuorokokeessa (n=15 miestä) havaittiin, että neljän viikon päivittäinen mustikkajauheesta tehdyn juoman nauttiminen muutti tutkittavien suolistomikrobistoa suotuisaan suuntaan ulosteesta mitattuna (Vendrame ym. 2011). Tutkimuksessa ulosteen bifidobakteerien ja *Lactobacillus acidophilus* -bakteerikantojen osuus suureni verrattuna muihin bakteerikantoihin mustikkajauhetta sisältävällä ruokavaliolla verrattuna kontrolliin. Toisessa vaihtovuorokokeessa (Wallace ym. 2015), jossa nautittiin boysenmarjoja, polyfenoleja ja kuitua sisältävää juomaa neljän viikon ajan, ei havaittu muutosta ulosteen bakteerikannoissa. Suoliston bakteeriston profiilissa ei havaittu muutoksia myöskään neljän vuorokauden vadelmapyreen nauttimisen jälkeen (Gill ym. 2010). Ruokavalio voi muuttaa monella tapaa suoliston mikrobien elinympäristöä vaikuttamalla muun muassa suolen tyhjenemisenopeuteen, pH:on ja vaihtamalla ruokavalion energiaravintoaineiden saantisuhteita. Ihmisten suoliston mikrobistoa pidetään melko stabiilina, eikä tietoa vielä ole, voidaanko sitä ruokavaliolla muuttaa (Scott ym. 2013).

6.4 N-nitrosoyhdisteiden ja marjojen syönnin yhteys paksusuolisyöpään

Punaisen ja prosessoidun lihan syöminen lisää paksusuolisyöpäriskiä (WCRF/AICR 2010), mutta tieteellinen näyttö NOC:iden yhteydestä paksusuolisyöpään on vielä riittämätöntä. Eläinkokeissa ulosteen NOC-pitoisuus ei aina ole ollut yhteydessä esisyövällisiin muutoksiin

paksusuolella (Parnaud ym. 2000, Bastide ym. 2015). Väestötutkimuksia ei ole, joissa olisi mitattu ulosteesta NOC:itä ja tutkittu niiden yhteyttä paksusuolisyöpään. Ei ole myöskään kattavaa tietokantaa elintarvikkeiden N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksista, mikä olisi tärkeää tulevaisuuden kannalta. Tämän takia NOC:iden yhteyttä paksusuolisyöpärisiin ei voi tämän hetkisen tutkimustiedon perusteella pitää kovinkaan vahvana, eikä ulosteen NOC-pitoisuudesta ole paksusuolen syöpärisin biomarkeriksi. NOC pitää sisällään monenlaisia nitrosoyhdisteitä, minkä takia olisi tärkeää kehittää yhä tarkempia mittaamenetelmiä, joilla yhdisteet saataisi vieläkin paremmin eroteltua. Kaikkia N-nitrosoyhdisteitä ei ole luokiteltu syöpävaarallisiksi, minkä takia niitä tulisi tutkia lisää. Näillä yhdisteillä voi olla eri lähtöaineet, ja niiden vaikutukset voivat olla elimistössä erilaiset. Eräs tutkija pohtii kommentissaan, voisiko nitrosoyhdisteiden muodostuminen suolistossa olla jopa DNA:ta suojaava keino, jolla haitalliset yhdisteet saadaan poistettua elimistöstä (Hogg 2007).

Myös marjojen yhteys paksusuolisyöpään on epidemiologisten tutkimusten mukaan edelleen epäselvä, kuten WCRF/AICR (2010) asian linjaa. Epidemiologisissa tutkimuksissa marjat on usein luokiteltu samaan luokkaan hedelmien kanssa, minkä takia niiden itsenäistä vaikutusta on tutkittu vasta vähän. Lisäksi marjojen syönte väestötasolla on esimerkiksi Suomessa hyvin alhaista (Helldán ym. 2013), mikä vaikeuttaa marjojen vaikutuksen tutkimista. Hedelmät marjat mukaan luettuna ovat hyvin heterogeeninen joukko erilaisia ruoka-aineita sisältäen eri yhdisteitä. Tämä voi olla myös yksi syy, miksi hedelmien ja marjojen kulutuksen yhteys paksusuolisyöpään ei ole aina ollut yhtenevä ja näyttö on edelleen puutteellinen. Esimerkiksi EPIC-tutkimuksessa (Leenders ym. 2015) havaittiin, että hedelmien (mukaan luettuna marjat) moninainen kulutus on yhteydessä suurentuneeseen peräsuolisyöpärisiin: tutkittavilla, jotka kuluttivat yli kahdeksaa eri hedelmää, oli 41 % suurentunut peräsuolisyöpärisi verrattuna tutkittaviin, jotka kuluttivat vähemmän kuin kolmea eri hedelmää tutkimusaikana. WCRF/AICR:n (2010) mukaan kuitupitoisten ruokien yhteys pienentyneeseen paksusuolisyöpärisiin on kuitenkin vakuuttava, minkä varjolla myös marjat saattavat pienentää riskiä sairastua paksusuolisyöpään. Lisää tutkimuksia tarvitaan polyfenolien yhteydestä paksusuolisyöpärisiin.

6.5 Tutkimuksen heikkoudet

Analyysimenetelmiin liittyy aina mittausvirhettä, kuten ruoankäytön mittaamisessa. Tutkimuksessa käytettiin kolmen vuorokauden ruokapäiväkirjojen keskiarvoa. AivoDiet-

ravintoaineidenlaskentaohjelma tuo haasteensa ravintoaineiden saannin laskemiseen. Virheen mahdollisuutta pienennettiin tutkimuksessa siten, että ruokapäiväkirjat tarkistettiin tutkittavien kanssa ja vain yksi henkilö tallensi ruokapäiväkirjat AivoDiet-ohjelmalla vähentäen tallentajien välistä vaihtelua. AivoDiet-ohjelma ei anna tietoa ruoka-aineiden käytöstä, mikä on ohjelman iso puute. Täten pystytään vain arvailemaan ravintoaineiden saantien perusteella, minkälaisia muutoksia tutkittavat ovat ruokavalionsa mahdollisesti tehneet tutkimuksen aikana. AivoDiet-ohjelman tietokanta ei myöskään sisällä ruokien polyfenolipitoisuuksia (muutamaa lukuun ottamatta) tai N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksia. Selenin suuri saanti kontrolliryhmässä tarkistettiin ja sitä selitti muutaman tutkittavan runsas parapähkinöiden syönti parapähkinän sisältäen paljon seleeniä.

Ulosteanalyysit tehtiin kontrolloidusti. Tutkimusryhmä teki NOC-mittauksia ensimmäistä kertaa, mikä vaati menetelmän kehittämistä. Ulostenäytteiden käsittely oli välillä haastavaa, eikä kaikkiin ongelmiin pystytty varautumaan etukäteen suunnittelusta huolimatta. Ulostet ovat heterogeenisiä rakenteeltaan - osa on hyvin viskooseja, osa ei. Tämän takia ulosteveden eristyksessä oltaisi voitu käyttää esimerkiksi 1:10 laimennusta kuten Russelin ym. tutkimuksessa (2011) tehtiin. Se saattaisi helpottaa näytteiden suodatusta. Ulostenäytteiden otto ei ole ongelmaton tutkittavienkaan kannalta, ja osalle niiden säilyttäminen kylmässä oli haastavaa. Jotkut tutkittavista sanoivat kärsivänsä ummetuksesta ennen näytteiden ottoa mahdollisesti jännityksestä johtuen. Näytteiden ottoon ja näytteiden käsittelyyn täytyy saada toimivat menetelmät, jotta ulostenäytteiden keräämistä voisi ajatella käytettävän laajemmista, enemmän tutkittavia sisältävissä interventio- tai väestötutkimuksissa.

Koska vastaavanlaisia tutkimuksia ei ole tehty, aineistolle ei pystytty etukäteen voimalaskelmaa. On siis mahdollista, että aineiston koko ei ollut riittävä havaitsemaan mahdollista marjojen vaikutusta N-nitrosoyhdisteiden muodostukseen suolistossa. Tutkimustuotteita lukuun ottamatta tutkittavien ruokavalio oli verrattain vapaa, mikä lisää tulosten hajontaa entisestään. Tutkimuksessa havaittiin, että N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksien keskihajonta pieneni tutkimuksen lopussa verrattuna tutkimuksen alkuun. Tätä voi selittää esimerkiksi punaisen lihan määrän vakiointi tai ulostenäytteiden käsittely. Tutkimuksen loppunäytteiden analyyseissä käytettiin ulostenäytteitä kahdelta tutkimuspäivältä, kun alkunäytteiden kohdalla käytettiin vain yhden vuorokauden näytettä. Tämä on voinut vaikuttaa N-nitrosoyhdisteiden tuloksiin. Polyfenolimetaboliitit mitattiin vain loppunäytteistä. On

mahdollista, että tutkittavat myös vähensivät ruokalajien vaihtelua ruokavaliossaan tutkimuksen aikana vaikuttaen näin tuloksiin.

6.6 Tutkimuksen vahvuudet

KarniMari-tutkimuksessa on paljon vahvuuksia. Tutkimuksessa muun muassa satunnaistettiin tutkittavat tutkimusryhmiin, tutkittavien määrä oli melko suuri verrattuna aiempiin tutkimuksiin, kesto oli melko pitkä, siinä oli mukana molemmat sukupuolet, tutkimustuotteiden määrä oli verrannollinen suomalaisten lihan syöntimäärään, N-nitrosoyhdisteet eroteltiin, tutkittavien keskeyttäminen oli vähäistä ja heidän sitoutumisensa tutkimukseen oli hyvää. Vaihtovuoro-koeasetelma olisi ollut eduksi tälle tutkimukselle, mutta asetelma ei sopinut KarniMari-tutkimuksen toiseen haaraan. Tutkittavien ruokavaliota ei juuri rajoitettu, punaisen lihan ja marjojen syöntimäärät olivat kohtuullisia ja tutkimustuotteet olivat erilaisia, minkä takia tutkimusruokavaliota on yleistettävissä myös käytäntöön. Aiemmissä tutkimuksissa tutkittavat ovat usein olleet miehiä, joten nämä tulokset ovat yleistettävissä sekä naisiin että miehiin. Tutkimus oli kestoltaan monia vastaavanlaisia tutkimuksia pidempi. Tutkimuksessa pystyttiin myös erottelemaan totaali NOC:istä N-hemi- ja N-tioliyhdisteet, mikä lisää tulosten luotettavuutta. Polyfenolimetaboliitteja ei ole aiemmin tutkittu punaista lihaa tutkivissa interventiotutkimuksissa.

Tutkimuksen keskeytti vain kaksi tutkittavaa. Tutkittavien ruokapäiväkirjojen mukaan sitoutuminen tutkimustuotteiden syömiseen oli hyvää – tutkittavat pääasiassa söivät tutkimustuotteet päivittäin. Marjaryhmäläisten kversetiinin ja myrisetiinin runsaampi saanti sekä polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien erot tutkimusryhmien välillä viittaavat siihen, että marjoja on marjaryhmässä nautittu. Polyfenolien tai marjojen saannista ei kuitenkaan ole vielä olemassa ulosteesta mitattavaa luotettavaa indikaattoria. Komplianssin varmistamiseksi tutkimuksessa olisi voitu esimerkiksi kerätä tutkittavilta tyhjät elintarvikepakkaukset, mikä olisi voinut edelleen parantaa tutkimusmyöntyvyyttä.

6.7 Käytännön merkitys ja tulevaisuus

Aiemmin ulosteen N-nitrosoyhdisteiden pitoisuutta ei ole tutkittu suomalaisilla. Tutkittavien erilainen geneettinen tausta, erilaiset tutkimusmenetelmät ja -asetelmat ja eri mittayksiköt

tutkimuksissa, hankaloittavat kaikki tulosten vertailua aiempiin tutkimuksiin. Tutkittavat olivat terveitä, melko nuoria aikuisia ja todennäköisesti keskimääräistä väestöä korkeakoulutetumpia, ja siten heidän terveyskäyttäytymisensä ja ruokavalionsa on voinut olla keskimääräistä terveellisempää. Näin ollen tämän tutkimuksen tulokset voi vain varauksella yleistää koskemaan koko väestöä. Ei ole tietoa, miten marjojen syönti vaikuttaa NOC-pitoisuuteen tai polyfenolimetaboliittien pitoisuuksiin suolistosairauksia tai paksusuolisyöpää sairastavilla henkilöillä tai syövästä selvinneillä henkilöillä, joita on koko ajan yhä enemmän syöpähoitojen kehittyessä.

Punaisen ja prosessoidun lihan paksusuolisyöpäriskiä lisäävän vaikutuksen mekanismi on edelleen epäselvä. Mahdollisesti monet tekijät yhdessä tai erikseen voivat vaikuttaa riskiin eri vaikutustapojen kautta. Esimerkiksi hemiraudan saanti ruokavaliosta, mikä saattaa vaikuttaa itsenäisesti suolistoon tai esimerkiksi NOC-muodostuksen kautta, on liitetty väestötutkimuksissa suurentuneeseen paksusuolisyöpäriskiin (Cao ym. 2016). Aiemmissä tutkimuksissa punaisena lihana on käytetty sekä sian- että naudanlihaa. Suomalainen riistaeläin, kuten hirvenliha ja kasvatettu poronliha, sisältävät rautaa vielä naudanlihaakin enemmän. On mahdollista, että niiden vaikutus NOC-muodostukseen saattaisi olla edellä mainittuja vieläkin suurempaa. Tulevaisuudessa myös erilaisten kasviproteiinilähteiden vaikutusta suolistoon ja paksusuolisyöpään voitaisi tutkia. KarniMari-aineistosta voitaisi selvittää suolistomikrobiston lisäksi esimerkiksi paksusuoleen päätyneiden proteiinien ja hiilihydraattien suolistossa tapahtuvien mikrobireaktioiden lopputuotteita – onko niissä tutkimusryhmien välillä eroa. N-nitrosoyhdisteiden yhteyttä paksusuolisyöpään ja muihin ruoansulatuselimistön syöpiin tulisi tutkia väestötasolla. Ulosteiden käsittelyyn tarvittaisi yhä helpompia käsittelymenetelmiä, mikä helpottaisi ulostenäytteiden käyttöä tutkimustyössä.

Interventio vaikutti tutkittavien ravintoaineiden saantiin jonkin verran, vaikka tavoitteena oli, ettei ravintoaineiden saanti juuri muuttuisi. Sianlihan syöminen lisäsi tutkittavien energian saantia erityisesti tyydyttyneestä rasvasta, minkä osuus ruokavaliossa nousi tutkittavilla edelleen yli ravitsemussuosituksen (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Rasvan saanti verrattuna ravitsemussuositukseen oli tutkittavilla tutkimuksen lopussa melko korkea (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Kuidun saanti jäi alle suositusten kontrolliryhmäläisillä. Erityisesti kontrolliryhmässä ruokavalion vaikutus kolesterolipitoisuuksiin oli epädullinen, mikä saattoi johtua edellä mainituista muutoksista ruokavaliossa.

Marjojen syönnin ansiosta marjaryhmäläisten kuidun saanti nousi tutkimuksen lopussa ravitsemussuosituksen suosittelemalle tasolle eli 3 g kuitua/MJ (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Vaikka marjojen syönti, kuidun runsaampi saanti ja polyfenolimetaboliittien suurempi pitoisuus ulosteessa ei tämän tutkimuksen mukaan vaikuta merkittävästi N-nitrosoyhdisteiden muodostukseen, voi niillä olla silti suoliston terveyttä edistävä vaikutus, mitä ei tässä tutkimuksessa pystytty osoittamaan. WCRF/AICR:n (2010) mukaan on vakuuttavaa näyttöä, että kuitupitoinen ruoka pienentää paksusuolen syöpäriskiä, minkä takia myös marjoja on suositeltavaa syödä päivittäin. Tällä koeasetelmalla ja tutkimusryhmällä marjojen syönti ei vaikuta NOC-muodostukseen, eikä siten vähennä punaisen lihan aiheuttamaa mahdollisesti syöpävaarallista NOC-muodostusta suolistossa. Täten varmin keino ehkäistä punaisen lihan haittoja on vähentää punaisen lihan syöntiä, mutta samalla muistaa monipuolinen, kasviksia ja marjoja sisältävä, ruokavalio. N-nitrosoyhdisteiden pitoisuus ei ole merkittävästi suurempi noin 60 g/d punaista lihaa syövillä kuin ei-punaista lihaa syövillä (Hughes ym. 2001). Näin ollen nykyinen punaisen lihan saantisuositus 500 g/vk (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014) on melko hyvin sopuoinnussa punaisen lihan vaikutuksen N-nitrosoyhdisteiden muodostukseen kanssa.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä tutkimuksessa neljän viikon yhtäjaksoinen marjojen syönti sianlihaa sisältävällä ruokavaliolla ei vaikuttanut merkitsevästi ulosteen N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuksiin terveillä koehenkilöillä. Koska hajonta niin N-nitrosoyhdisteiden kuin polyfenolimetaboliittien pitoisuuksissa oli suurta, tulisi aihetta tutkia vielä suuremmalla joukolla. Erilaisista koeasetelmista ja tutkittavista johtuen tuloksia on hankala vertailla aiempiin punaista lihaa ja N-nitrosoyhdisteitä tutkineisiin tutkimuksiin. Luotettavan polyfenolimetaboliitin löytyminen marjojen syönnin mittariksi vaatii lisää useita interventiotutkimuksia. Marjojen syönti lisäsi tutkittavien C-vitamiinin sekä kuidun saantia suomalaisten ravitsemussuosittelun suosittelemalle tasolle. Sianlihan syöminen lisäsi tutkittavien tyydyttyneen rasvan saantia. Ulosteen N-nitrosoyhdisteiden yhteys paksusuolen syöpäriskiin on vielä epäselvä.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Abraham S, Khandelwal N. Ascorbic acid and dietary polyphenol combination protect against genotoxic damage induced in mice by endogenous nitrosation. *Mutat Res* 2013;757:167–72.

Alexander D, Miller A, Cushing C, Lowe K. Processed meat and colorectal cancer: a quantitative review of prospective epidemiological studies. *Eur J Cancer Prev* 2010;19:328–41.

Alexander D, Weed D, Cushing C, Lowe K. Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 2011;20:293–307.

Bastide N, Pierre F, Corpet D. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res* 2011;2:177–84.

Bastide N, Chenni F, Audebert M ym. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res* 2015;75:870–9.

Ben Q, Zhong J, Liu J, Wang L, Sun Y, Yv L, Yuan Y . Association between consumption of fruits and vegetables and risk of colorectal adenoma: A PRISMA-Compliant meta-analysis of observational studies. *Medicine Baltimore* 2015;94:e1599:1–12.

Bingham S, Hughes R, Cross A. Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J Nutr* 2002;132:3522S–5S.

Bradbury K, Appleby P, Key T. Fruit, vegetable, and fiber intake in relation to cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am J Clin Nutr* 2014;100:394S–8S.

Brown E, Latimer C, Allsopp P ym. *In vitro* and *in vivo* models of colorectal cancer: antigenotoxic activity of berries. *J Agric Food Chem* 2014;62:3852–66.

Cao H, Wang C, Chai R, Dong Q, Tu S. Iron intake, serum iron indices and risk of colorectal adenomas: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Care* 2016.doi:10.1111/ecc.12486 [Epub ahead of print].

Carr PR, Walter V, Brenner H, Hoffmeister M. Meat subtypes and their association with colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2016;138:293–302.

Cerdá B, Periago P, Espín C, Tomas-Barberán F. Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon micflora from ellagic acid and related compounds. *J Agric Food Chem* 2005;53:5571–7.

Chan D, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood D, Kampman E, Norat T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS One* 2011;6:e20456.

Coates E, Popa G, Gill C, McCann M, McDougall G, Stewart D, Rowland I. Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *J Carcinog* 2007;6:1–10.

Cross A, Pollock J, Bingham S. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res* 2003;63:2358–60.

Dall'Asta M, Calani L, Tedeschi M, Jechiu L, Brighenti F, Del Rio D. Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition* 2012;28:197–203.

Davis M, Lisowyj M, Zhou L ym. Induction of colonic aberrant crypts in mice by feeding apparent N-nitroso compounds derived from hot dogs. *Nutr Cancer* 2012;64:342–9.

Demeyer D, Mertens B, De Smet S, Ulens M. Mechanisms linking colorectal cancer to the consumption of (processed) red meat: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;56:2747–66.

El-Seedi H, El-Said A, Khalifa S, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson AK, Verpoorte R. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J Agric Food Chem* 2012;60:10877–95.

Evira. Nitriitti. <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/koostumus/elintarvikeparanteet/lisaaineet/tietoa-yksittaisista-aineista/nitriitti/> (päivitetty 14.4.2016).

Freese R, Voutilainen E. Vitamiinit ja kivennäisaineet sekä muut ravinnon yhdisteet. Kirjassa: Aro A, Mutanen M, Uusitupa M, toim. Ravitsemustiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2012, s.142–148.

- Gill C, McDougall G, Glidewell S ym. Profiling of phenols in human fecal water after raspberry supplementation. *J Agric Food Chem* 2010;58:10389–95.
- González-Barrio R, Edwards C, Crozier A. Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies. *Drug metabolism and disposition* 2011;39:1680–8.
- Hebels D, Brauers K, van Herwijnen M ym. Time-series analysis of gene expression profiles induced by nitrosamides and nitrosamines elucidates modes of action underlying their genotoxicity in human colon cells. *Toxicol Lett* 2011;207:232–41.
- Hebels D, Sveje K, de Kok M ym. Red meat intake-induced increases in fecal water genotoxicity correlate with pro-carcinogenic gene expression changes in the human colon. *Food Chem Toxicol* 2012;50:95–103.
- Helldán A, Raulio S, Kosola M, Tapanainen H, Ovaskainen ML, Virtanen S. *Finravinto 2012 -tutkimus*, Helsinki: THL, Raportti 16/2013;33–47.
- Hellström J, Törrönen R, Mattila P. Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *J Agric Food Chem* 2009;57:7899–906.
- Hogg N. Red meat and colon cancer: Heme proteins and nitrite in the gut. A commentary on “Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract”. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1037–9.
- Holtrop G, Johnstone A, Fyfe C, Gratz S. Diet composition is associated with endogenous formation of N-nitroso compounds in obese men. *J Nutr* 2012;142:1652–8.
- Hughes R, Cross A, Pollock J & Bingham S. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis* 2001;22:199–202.
- Hughes R, Pollock J, Bingham S. Effect of vegetables, tea, and soy on endogenous N-nitrosation, fecal ammonia, and fecal water genotoxicity during a high red meat diet in humans. *Nutr Cancer* 2002;42:70–77.
- IARC. Agents classified by the IARC Monographs, volumes 1–111. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (päivitetty 23.10.2014).
- IARC. Colorectal Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (luettu 28.1.2015).

- Janicke B, Hegardt C, Krogh M ym. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr Cancer* 2011;63:611–22.
- Järvinen H, Kouri M, Österlund P, suoliston syöpä. Kirjassa: syöpätaudit: 5. painos, Duodecim (luettu 27.6.2013).
- Jenner A, Rafter J, Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: The extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 2005;38:763–72.
- Jin H, Leng Q, Li C. Dietary flavonoid for preventing colorectal neoplasms. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;8:CD009350.
- Joosen A, Kuhnle G, Aspinall S ym. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis* 2009;30:1402–7.
- Joosen A, Lecommandeur E, Kuhnle G, Aspinall S, Kap L, Rodwell S. Effect of dietary meat and fish on endogenous nitrosation, inflammation and genotoxicity of fecal water. *Mutagenesis* 2010;25:243–7.
- Kim E, Coelho S, Blachier F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition Research* 2013;33:983–94.
- Knekt P, Järvinen R, Dich J, Hakulinen T. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer* 1999;80:852–6.
- Koponen J, Happonen A, Mattila P, Törrönen A. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem* 2007;55:1612–9.
- Kuhnle G, Bingham S. Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 2007;5:1355–7.
- Kuhnle G, Story G, Reda T, Mani A, Moore K, Lunn J, Bingham S. Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1040–7.
- Kylli P, Nohynek L, Puupponen-Pimiä R ym. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European cranberry (*Vaccinium microcarpon*) proanthocyanidins: isolation, identification, and bioactivities. *J Agric Food Chem* 2011;59:3373–84.

Lee S, Munerol B, Pollard S ym. The reaction of flavanols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. *Free Radic Biol Med* 2006;40:323–34.

Leenders M, Siersema P, Overvad K ym. Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2015;137:2705–14.

Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T ym. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res* 2006;66:1859–65.

Loh Y, Jakszyn P, Luben R, Mulligan A, Mitrou P, Khaw KT. N-nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. *Am J Clin Nutr* 2011;93:1053–61.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.

Massey R ym. An investigation of the endogenous formation of apparent total N-nitroso compounds in conventional flora and germ free rats. *Food Chem Toxicol* 1991;26:595–600.

Mattila P, Hellström J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem* 2006;54:7193–9.

Mecklin JP, Malila N, Kääriäinen H, Pajari AM, Färkkilä M. Suolistosyövän riskitekijät ja ehkäisyn mahdollisuudet. *Duodecim* 2016;132:1145–52.

Minker C, Duban L, Karas D, Järvinen P, Lobstein A, Muller CD. Impact of procyanidins from different berries on caspase 8 activation in colon cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:154164.

Núñez-Sánchez M, González-Sarrías A, Romo-Vaquero M ym. Dietary phenolics against colorectal cancer. From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res* 2015;59:1274–91.

Oostindjer M, Alexander J, Amdam G ym. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Sci* 2014;97:583–596.

- Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* 2008;138:562–6.
- Parnaud G, Pignatelli B, Peiffer G, Taché S, Corpet D. Endogenous N-nitroso compounds, and their precursors, present in bacon, do not initiate or promote aberrant crypt foci in the colon of rats. *Nutr Cancer* 2000;38:74–80.
- Paturi M, Tapanainen H, Reinivuo H, Pietinen P, toim. *Finravinto 2007 -tutkimus*. Helsinki: Kansanterveyslaitoksen julkaisuja, B23/2008;33–124.
- Pierre F, Freeman A, Taché S, Van der Meer R, Corpet D. Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *J Nutr* 2004;134:2711–6.
- Pierre F, Santarelli R, Allam O ym. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer* 2010;62:567–73.
- Pierre F, Martin O, Santarelli R ym. Calcium and α -tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *Am J Clin Nutr* 2013;98:1255–62.
- Puupponen-Pimiä R, Seppänen-Laakso T, Kankainen M ym. Effects of ellagitannin-rich berries on blood lipids, gut microbiota, and urolithin production in human subjects with symptoms of metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:2258–63.
- Russell W, Gratz S, Duncan S ym. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr* 2011;93:1062–72.
- Santarelli R, Naud N, Taché S ym. Calcium inhibits promotion by hog dog of 1,2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci in rat colon. *Int J Cancer* 2013;133:2533–41.
- Scott K, Gratz S, Sheridan P, Flint H, Duncan S. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* 2013;69:52–60.
- Silvester K, Bingham S, Pollock J, Cummings J, Neill I. Effect of meat and resistant starch on fecal excretion of apparent N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel. *Nutr Cancer* 1997;29:13–23.

Suomen Syöpärekisteri. Ajantasaiset perustaulukot: Koko maa.

<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/ajantasaiset-perustaulukot/koko-maa/> (päivitetty 8.10.2014).

Tarko T, Duba-Chodak A, Zajac N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2013;64:79–84.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Marjat. Fineli. Elintarvikkeiden koostumustietokanta. Versio 17. Helsinki 2016.

<https://fineli.fi/fineli/fi/elintarvikkeet?foodType=ANY&ingredientClass=BERRY&portionUnit=G&portionSize=100&sortByColumn=name&sortOrder=asc&component=2331> (luettu 10.11.2016).

Tricker A. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:226–68.

Truchado P, Larrosa M, García-Conesa M ym. Strawberry processing does not affect the production and urinary excretion of urolithins, ellagic acid metabolites, in humans. *J Agric Food Chem* 2012;60:5749–54.

Valtion ravitsemusneuvottelukunta. Terveyttä ruoasta. Suomalaiset ravitsemussuosituksset 2014. Tampere: Juvenes Print – Suomen Yliopistopaino 2014.

Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, Arioli S, Klimis-Zacas D, Porrini M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J Agric Food Chem* 2011;59:12815–20.

Vogel J, Boersma van-Eck W, Sesink A, Jonker-Termont D, Kleibeuker J, van der Meer R. Dietary heme injures surface epithelium resulting in hyperproliferation, inhibition of apoptosis and crypt hyperplasia in rat colon. *Carcinogenesis* 2008;29:398–403.

Wallace A, Eady S, Hunter D ym. No difference in fecal levels of bacteria or short chain fatty acids in humans, when consuming fruit juice beverages containing fruit fiber, fruit polyphenols, and their combination. *Nutr Res* 2015;35:23–34.

WCRF/AICR. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC:AICR.2007.

WCRF/AICR. Systematic literature review continuous update project report: the associations between food, nutrition and physical activity and the risk of colorectal cancer. WCRF and American Institute for Cancer Research, Washington DC 2010:1–855.

WCRF/AICR. Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer. 2011.

WHO. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (luettu 28.1.2015).

Williamson G, Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr* 2010;104:S48–66.

Xie L, Mo M, Jia HX, Liang F, Yuan J, Zhu J. Association between dietary nitrate and nitrite intake and sitespecific cancer risk: evidence from observational studies. *Oncotarget* 2016;7:56915–32.

Zhu Y, Wang PP, Zhao J ym. Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. *Br J Nutr* 2014;111:1109–17.

LIITTEET

LIITE 1. Ohje tutkimusruokavaliosta ja sen rajoitteista

Hyvä KarniMari-tutkimukseen osallistuja,

Tutkimuksen aikana syötävät liha- ja marjatuotteet saat tutkimusyksiköstä. Kaikki tutkimushenkilöt syövät lihatuotteita ja osa tutkittavista myös marjoja. On tärkeää, että noudatat seuraavia ohjeita tutkimusjakson aikana. Tutkimuslihojen ja marjojen syömistä koskien olet saanut erilliset ohjeet.

- Syöthän päivittäin kaikki sille päivälle tarkoitetut tuotteet annettujen ohjeiden mukaisesti.
- Ethän syö muuta punaista lihaa (porsas, nauta, lammas, hirvi, poro) tutkimustuotteiden lisäksi. Tutkimuksen aikana voit syödä siipikarjan lihaa (kanaa, kalkkunaa) normaalisti.
- Kalaa saat syödä kohtuudella (2 annosta viikossa).
- Jos et kuulu marjaryhmään, älä syö marjoja tutkimuksen aikana (marjamehut, -hillot, -puurot ym.). Sallittuja marjoja sisältäviä tuotteita ovat kuitenkin: o kaupan valmiiksi maustetut marjajugurtit (sisältävät vain vähän marjaa) o kaupan marjakeitot, mutta rajoita käyttö 1,5 dl /päivä.
- Hedelmiä voit nauttia normaalisti.
- Rucolaa, pinaattia ja punajuurta saat syödä kohtuudella (2 annosta viikossa), koska ne sisältävät runsaasti nitraattia.
- C-vitamiinivalmisteiden (tabletit) ja C-vitamiinia sisältävät monivitamiinitabletit (Multitabs, Multivita ym.) sekä luontaistuotteiden (mm. Spirulina, pakurikäöpä) käyttö tutkimuksen aikana on kiellettyä. D-vitamiinitabletit ovat sallittuja, samoin magnesium- ja kalsiumtabletit.
- Maitohappobakteereja sisältävät elintarvikkeet (esim. piimä, jogurtti, mehut) ovat sallittuja tutkimuksen aikana, mutta maitohappobakteeritabletit (esim. Relatabs) ovat kiellettyjä.
- Saat syödä proteiinipatukoita, -pirtelöitä ja muita proteiini-/ palautusvalmisteita normaaliin tapaan.
- Ethän käytä kasvisterolilla tai -stanolilla täydennettyjä tuotteita (Benecol, Becel pro.activ)
- Alkoholia voit nauttia tutkimuksen aikana kohtuudella. Kohtuukäytön rajat ovat naisilla alle 5 annosta kerralla ja alle 16 annosta viikossa, miehillä alle 7 annosta kerralla ja alle 24 annosta viikossa.

Ruokavaliota ei ole tarpeen muokata muilta osin. Tutkimuksen kannalta on tärkeää, että syöt muuten mahdollisimman samalla tavalla kuin yleensä. Täytähän ruokapäiväkirjaa ohjeiden mukaisesti. Jos jostain syystä et pysty jonain päivänä syömään kaikkia tuotteita (esim. sairastuminen), ota yhteyttä tutkimuskoordinaattoriin.

Ystävällisin terveisin,

KarniMari-tutkimusryhmä

LIITE 2. KarniMari-tutkimuksen sianlihatuotteiden ainesosat

Taulukko 8. KarniMari-tutkimuksessa käytettyjen sianlihatuotteiden ainesosat

Tuote	Ainesosat	Muuta
Jauheliha	suomalainen porsaanliha 100 %.	
Nakki	suomalainen porsaanliha, vesi, kamara, perunajauho, lisätty suola (1,6 %), dekstroosi, perunakuitu, lihaproteiini, mausteet (mm. korianteri), aromit (mm. mustapippuri, inkivääri, paprika), savuaromi	Lihapitoisuus 72 %, laktoositon, gluteeniton ja proteiinipitoinen
Pekoni	suomalainen porsaanliha, lisätty suola (1,9 %), hapettumisenestoaine (E301), säilöntäaine (E250)	Lihapitoisuus 95 %
Fileesuikaleet	suomalainen porsaanliha 100 %	
Kokolihaleikkele	suomalainen porsaanliha (94 %), vesi, perunatärkkelys, suola (lisättyä suolaa 1,8 %), luontainen aromi, mineraalisuola (natrium- ja kaliumkloridi)	Lihapitoisuus 94 %, laktoositon, gluteeniton, runsasproteiininen
Grillimakara	suomalainen porsaanliha, vesi, kamara, perunajauho, lisätty suola (1,6 %), dekstroosi, perunakuitu, lihaproteiini, mausteet (mm. korianteri), aromit (mm. mustapippuri, inkivääri, paprika), savuaromi	Lihapitoisuus 72 %, laktoositon, gluteeniton, proteiinipitoinen
Nyhtöpossu	Suomalainen porsaanliha, tomaattisose, sokeri, fariinisokeri, punaviinietikka, lisätty suola (1,2 %), mausteet (mm. chili, valkosipuli, sipuli), aromit (mm. savu), muunnettu maissitärkkelys, väri (E150c), sakeuttamisaine (ksantaanikumi)	100 g tuotetta käytetty 110 g lihaa, laktoositon, gluteeniton

LIITE 3. Ohjeet liha-annosten nauttimista varten

Saat tutkimukseen osallistumisen aikana viikoittain tutkimustuotteet. Ensimmäinen tuote-erä on kylmälaukussa ja tarkoituksena on, että noudat seuraavat tuote-erät samalla kylmälaukulla. Huomioithan, että tuotteet vaativat kylmäsäilytyksen, joten huolehdiathan kylmäketjun katkeamattomuudesta.

Tutkimustuotteina ovat:

- jauhelihaa
- nakkeja / grillimakkaraa
- pekonia
- fileesuikaleita
- kokolihaleikkelettä
- pulled porkia (nyhtöpossua)

Saat tuotteiden mukana ruuanvalmistusohjeita tuomaan inspiraatiota tuotteiden nauttimista varten. Ohjeissa kerrotaan, kuinka monta annosta niistä syntyy (useimmiten kaksi, sinun on tarkoitus syödä kummatkin annokset, toinen esim. seuraavana päivänä). Huomioi, että lihasta irtoava rasva on tarkoitus myös syödä, ethän siis kaada esim. pekonista irtoavaa rasvaa pois. Voit toki valmistaa lihan myös muiden reseptien mukaan, ja mikään ei estä syömästä esim. nakkeja sellaisenaan pakkauksesta.

Tuotteet on pakattu siten, että pakkauksessa on kaksi annosta (paitsi kokolihaleikkeleissä, jossa on noin 3 annosta). Tutkimustuotteiden päiväannokset ovat:

- jauhelihaa 100g JA nakkeja 2 kpl (80g) TAI
- pekonia 4 siivua (85g) JA fileesuikaleita 75g TAI
- kokolihaleikkelettä 6 viipaletta (45g) JA jauhelihaa 100g TAI
- grillimakkaraa 1 kpl (100g) JA pulled porkia (nyhtöpossua) 50g

Päivän aikana on siis tarkoitus syödä 2 liha-annosta. Viikon aikana tulee siis syödä yhteensä 14 annosta. Voit itse päättää minä päivänä syöt kunkin päiväannoksen. Voit myös sekoittaa päivän eri annoksia keskenään, kunhan et valitse kokolihaleikkelettä ja fileesuikaleita samalle päivälle. Jos jokin annoksista jää päivän aikana syömättä, syö se seuraavien päivien aikana. Tutkimuksen onnistumisen kannalta on tärkeää, että jokainen liha-annos tulee syötyä.

Nautinnollisia hetkiä liha-aterioiden parissa!

LIITE 4. Ohjeet marja-annosten nauttimista varten

Saat tutkimusjakson aikana syötävät marjat viikoittain tutkimusyksiköstä.

Tutkimusmarjoina on:

- Mustikkaa 200 g x 2
- Mansikkaa 250 g
- Puolukkaa 200 g
- Vadelmaa 200 g
- Mustaherukkaa 200 g
- Hillaa 200 g

Viikon jokaisena päivänä sinun tulisi syödä marjoja 200 grammaa (mansikkaa 250 g). Marjat on jaettu valmiisiin annoksiin. Voit itse päättää minä päivänä syöt mitäkin marjaa. Voit myös päättää, käytätkö päivittäin yhden pussin tiettyä marjaa vai otatko marjoja eri pusseista, kuitenkin niin, että **päivittäinen annosmäärä on n. 200 g**. Voit jakaa päivittäisen marja-annoksen syömisen usealle kerralle päivässä, kaikkea ei tarvitse syödä yhdellä aterialla.

Kaikki marjat ovat kotimaista pakastemarjaa ja voit käyttää ne sellaisenaan ilman kuumentamista. Voit säilyttää marjat pakastimessa tai jääkaapissa. Jos säilytät mansikkaa tai vadelmaa jääkaapissa, käytä ne parin päivän kuluessa sulattamisesta. Marjat saat syödä sellaisenaan, sokerin kanssa, jogurtin, puuron tai smoothien joukossa jne. Voit myös käyttää marjoja ruuanlaitossa – lämmittäminen, kuumennus ym. ei haittaa.

Ethän syö muita marjoja tai marjatuotteita (mukaan lukien marjamehut, -hillot, -puurot ym.) tutkimusjakson aikana. Sallittuja marjoja sisältäviä tuotteita tutkimusjakson aikana ovat kuitenkin:

- kaupan valmiiksi maustetut marjajogurtit (sisältävät vain vähän marjaa)
- kaupan marjakeitot, mutta rajoita käyttö 1,5 dl /päivä.

Tutkimuksen onnistumisen kannalta on tärkeää, että syöt jokaisen marja-annoksen viikon aikana ja kaikki marjat tulisi syötyä.

Nautinnollisia hetkiä marjaherkkujen parissa!

Hyvä tutkimushenkilö,

Olet saanut näytteenottovälineet ulostenäytteen keräämiseksi. Kerää näytteet **kahdelta päivältä ennen kuin aloitat tutkimustuotteiden syömisen varsinaisella tutkimusjaksolla.**

Styroxlaukku sisältää seuraavat näytteenottoon tarvittavat välineet:

- 2 kylmävaraajaa
- Kaarimaljoja
- Iso valkoinen muovipussi
- Kertakäyttölusikoita 2 kpl
- Kertakäyttöhanskoja näytteenottoa varten (2 paria)
- Vaaka
- Nimelläsi varustettu pakasterasia (Orthex)
- 2 minigrip-pussia, joissa molemmissa
 - o 1 kannellinen muovipurkki
 - o 1 näyteputki, jossa näytteenottoa varten sisäänrakennettu lusikka
- Permanenttitussi
- Lomake näytteenkeräystietoja varten

Näytteenotto:

Lue ohje huolella läpi ennen näytteenottoa.

- **Pakasta kylmävaraajat** hyvissä ajoin ennen näytteen palautusta. Näytteet palautetaan tutkimusyksikköön pakastettuna ja kylmävaraajien kanssa styroxlaukkuun pakattuna.
- **Ulostenäyte kerätään kahdelta päivältä.** Päivien ei tarvitse olla peräkkäiset, mutta mielellään lähellä toisiaan.
- **Kaikki** keräyspäivän tuotokset **punnitaan ensin vaa'alla** ja painot merkitään lomakkeeseen. Vain **yhdestä uloste-erästä per päivä otetaan näytteet** seuraavaa ohjetta noudattaen:
 - o Ulostaa kaarimaljalle. **Punnitse tuotos vaa'alla ja merkitse paino lomakkeeseen.**
 - o Jos ulostat useita kertoja päivässä, muistathan punnita kaikki tuotokset ja merkitä lomakkeeseen.
 - o Ota päivittäinen näyte vain yhdeltä ulostekerralta, ei siis kaikilta kerroilta.
 - o Ota näyteputki ja –purkki pussista, jossa lukee PÄIVÄ 1.

(2/2)

- Ota ulostetta ensin näyteputkeen (tarrassa: Mikronäyte A) putken sisältämällä lusikalla **reilun lusikallisen** verran ulosteen keskikohdalta, ei alussa tulevasta mahdollisesti kovemmasta ”tulpasta”. Sulje korkki huolellisesti.
- Ota ulostetta (keskikohdalta) kertakäyttölusikalla kannelliseen muovipurkkiin (tarrassa: NÄYTE1A) vähän **yli puolet** purkin tilavuudesta. Sulje kansi huolellisesti. Kaikkea ulostetta ei tarvitse laittaa putkeen, kaada loput pönttöön.
- Huolehdiathan, ettei ulostetta jää putken tai purkin ulkopuolelle.
- **Merkitse** putkessa sekä purkissa olevaan tarraan **näytteenottopäivämäärä** permanenttitussilla.
- **Laita putki ja purkki minigrip-pussissa** Orthex-pakasterasiaan, jossa on nimesi, ja **pakasta välittömästi**.
- Suorita näytteenotto samalla tavalla myös PÄIVÄNÄ 2.

Näytteiden säilytys kotona ja kuljetus tutkimusyksikköön:

- **Säilytä näytteet pakastimessa** nimikoidussa pakasterasiassa siihen asti, kunnes toimitat näytteet Viikkiin.
- Tuo pakastetut näytteet **pakastettujen kylmävaraajien** kanssa styroxlaukussa.
 - Kuljetusta varten laita kylmävaraajat ja Orthex-pakasterasiassa olevat näytteet isoon muovipussiin ja solmi pussi tiiviiksi paketiiksi. Tällä varmistetaan, että näyte ei pääsisi sulamaan kuljetuksen aikana.
- Pakastetut näytteet voit palauttaa tutkimusyksikköön Viikkiin
- Minimoi näytteiden oloaika pakastimen ulkopuolella, **näytteet eivät saa sulaa** kuljetuksen yhteydessä!
- Muistathan palauttaa myös täytetyn lomakkeen.

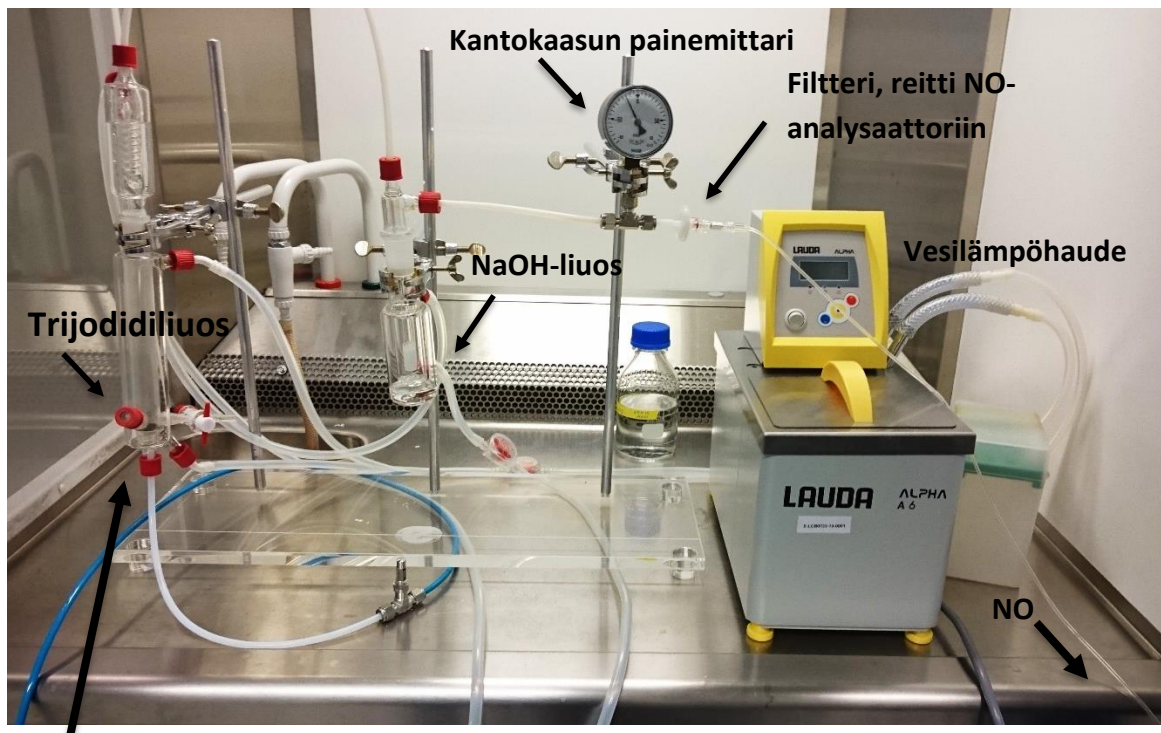
Näytteenotto ja purkitus on helpointa suorittaa kotona, missä kylmäsäilytys/pakastaminen onnistuu paremmin. Jos ulostekertoja on useita päivän aikana, **varaudu punnitsemaan ulosteesi myös kodin ulkopuolella**. Tällöin riittää, että pidät mukanasasi vaakaa, kaarimaljaa, ja punnituslomaketta. Varaa mukaasi myös roskapussi, jossa voit laittaa likaisen kaarimaljan roskikseen. Ulosta kaarimaljalle, punnitse ja merkitse paino lomakkeeseen.

KIITÄMME SINUA OSALLISTUMISESTASI!

Ystävällisin terveisin,
KarniMari-tutkimusryhmä

LIITE 6. Kuva huuhteluastiasta

Kuva 6. N-nitrosoyhdisteiden mittauksessa käytetty huuhteluastia (engl. purge vessel).



Näytteen
injektointi

LIITE 7. Polyfenolimetaboliittien korrelaatiotuloksia

(1/2)

Taulukko. Polyfenolimetaboliittien, polyfenolien ja kuidun saannin ja marjojen syönnin välinen korrelaatio (Spearmanin järjestyskorrelaatio rho, ρ) tutkimusviikolla 4.

Yhdiste	ρ	Ferulahappo	Protokatekiinihappo	3,4-Dihydroksifenyylietikkahappo	Kahvihappo	p-kumariinihappo	Sinappihappo	Homovanilliinihappo	Vanilliinihappo	Marjojen kulutus, g	Kuitu, g	Myrsetiini, μg	Kversetiini, μg
Ferulahappo		1	-0,041	0,460**	0,304	0,236	0,342*	0,011	0,178	0,071	0,068	0,083	0,243
	N	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Protokatekiinihappo		-0,041	1	0,094	-0,071	0,24	0,11	0,121	0,072	0,357*	0,166	0,452**	0,437**
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
3,4-Dihydroksifenyylietikkahappo		0,460**	0,094	1	-0,027	0,097	0,283	-0,032	0,461**	0,202	0,087	0,147	0,313
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Kahvihappo		0,304	-0,071	-0,027	1	0,345*	0,04	0,152	-0,086	0,366*	0,143	0,231	0,05
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
p-kumariinihappo		0,236	0,24	0,097	0,345*	1	0,072	0,151	0,096	0,356*	0,153	0,419**	0,187
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Sinappihappo		0,342*	0,11	0,283	0,04	0,072	1	0,073	0,329*	0,047	-0,02	0,088	0,394*
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Homovanilliinihappo		0,011	0,121	-0,032	0,152	0,151	0,073	1	0,09	0,099	0,212	0,034	0,098
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37

(2/2)

Yhdiste	<i>p</i>	Ferulahappo	Protokatekiinih appo	3,4-Dihydroksifeny ylietikkahappo	Kahvihappo	p-kumariinihappo	Sinappihappo	Homovaniliinih appo	Vanilliinihappo	Marjojen kulutus, g	Kuitu, g	Myrsetiini, µg	Kvsetiini, µg
Vanilliinihappo		0,178	0,072	0,461**	-0,086	0,096	0,329*	0,09	1	0,219	-0,006	0,075	0,358*
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Marjojen kulutus, g		0,071	0,357*	0,202	0,366*	0,356*	0,047	0,099	0,219	1	0,351*	0,804**	0,551**
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	43	43	43	43
Kuitu, g		0,068	0,166	0,087	0,143	0,153	-0,02	0,212	-0,006	0,351*	1	0,395**	0,422**
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	43	43	43	43
Vesiliukoinen polysakkaridi, g		0,067	0,340*	0,153	0,031	0,084	0,107	0,340*	0,087	0,312*	0,833**	0,353*	0,482**
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	43	43	43	43
Myrsetiini, µg		0,083	0,452**	0,147	0,231	0,419**	0,088	0,034	0,075	0,804**	0,395**	1	0,667**
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	43	43	43	43
Orgaaniset hapot, g		0,087	0,3	0,211	0,111	0,057	0,134	-0,047	0,018	0,619**	0,438**	0,605**	0,631**
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	43	43	43	43
Kvsetiini, µg		0,243	0,437**	0,313	0,05	0,187	0,394*	0,098	0,358*	0,551**	0,422**	0,667**	1
	N	36	37	37	37	37	37	37	37	43	43	43	43

*Spearmanin korrelaatio p-arvo < 0,05

**Spearmanin korrelaatio p-arvo < 0,01

LIITE 8. N-nitrosoyhdisteiden, punaisen lihan ja marjojen välisiä korrelaatiotuloksia

Taulukko. N-nitrosoyhdisteiden pitoisuuden ja punaisen lihan sekä marjojen syönnin välinen korrelaatio (Spearmanin järjestyskorrelaatio rho, ρ) tutkimusviikoilla 0 ja 4.

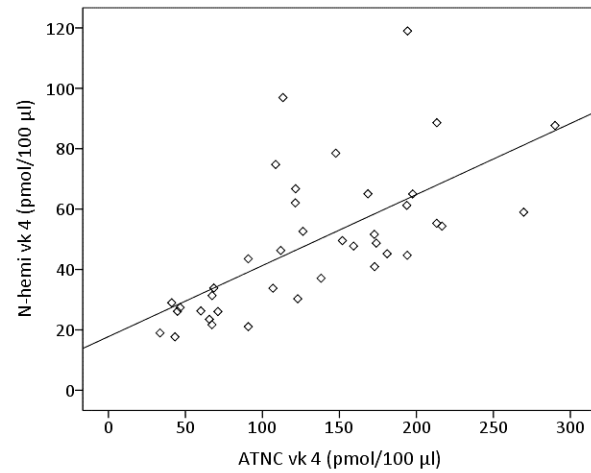
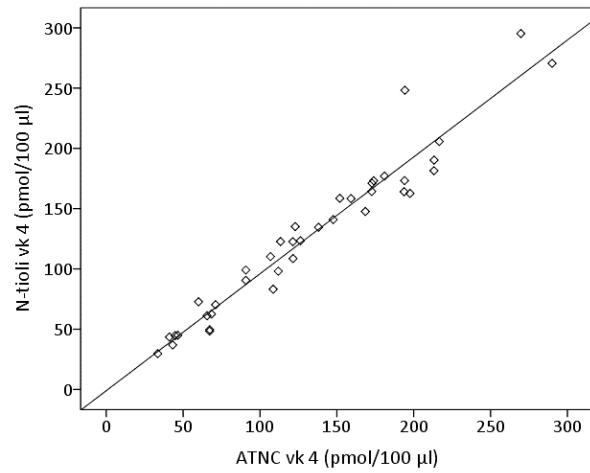
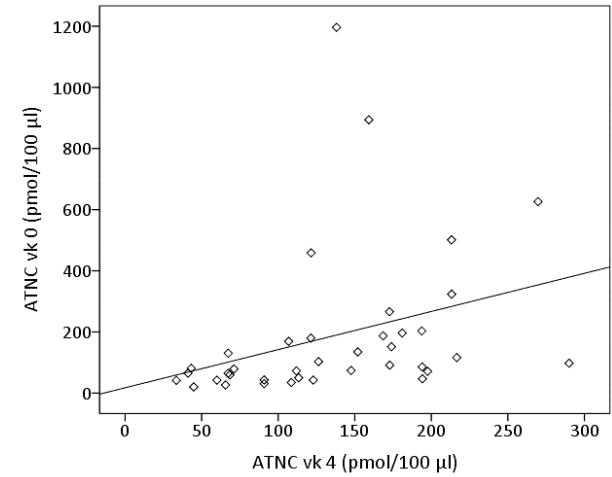
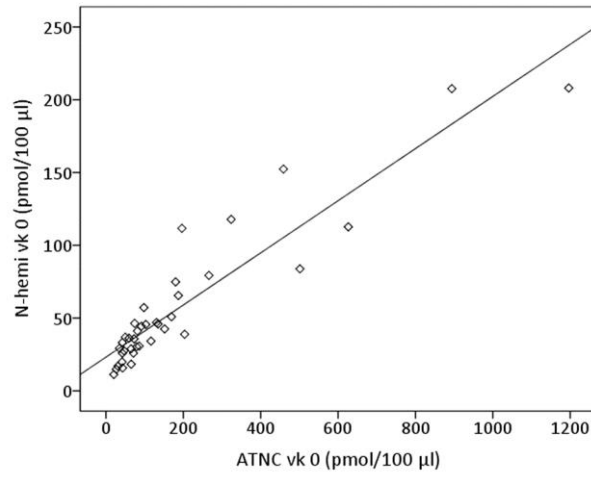
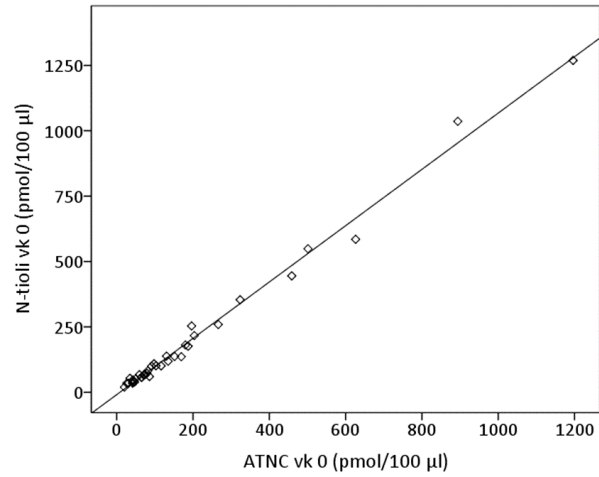
	ρ	Tot NOC vk 0	N-tioli vk 0	N-hemi vk 0	Tot NOC vk 4	N-tioli vk 4	N-hemi vk 4	Punainen liha g, vk 0	Marjat g, vk 0	Punainen liha g, vk 4	Marjat g, vk 4
Tot NOC vk 0		1	0,983**	0,909**	0,588**	0,556**	0,376*	0,275	-0,23	0	0,059
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
N-tioli vk 0		0,983**	1	0,934**	0,539**	0,497**	0,372*	0,221	-0,274	0,039	0,024
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
N-hemi vk 0		0,909**	0,934**	1	0,497**	0,488**	0,450**	0,097	-0,245	0,091	-0,03
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
Tot NOC vk 4		0,588**	0,539**	0,497**	1	0,980**	0,731**	0,218	-0,259	-0,06	-0,144
	N	38	38	38	39	39	39	39	39	39	39
N-tioli vk 4		0,556**	0,497**	0,488**	0,980**	1	0,696**	0,192	-0,219	-0,047	-0,163
	N	38	38	38	39	39	39	39	39	39	39
N-hemi vk 4		0,376*	0,372*	0,450**	0,731**	0,696**	1	0,119	-0,377*	0,112	-0,247
	N	38	38	38	39	39	39	39	39	39	39
Punainen liha g, vk 0		0,275	0,221	0,097	0,218	0,192	0,119	1	-0,101	-0,109	0,245
	N	38	38	38	39	39	39	43	43	43	43
Marjat g, vk 0		-0,23	-0,274	-0,245	-0,259	-0,219	-0,377*	-0,101	1	0,111	0,169
	N	38	38	38	39	39	39	43	43	43	43
Punainen liha g, vk 4		0,00	0,039	0,091	-0,06	-0,047	0,112	-0,109	0,111	1	-0,156
	N	38	38	38	39	39	39	43	43	43	43
Marjat g, vk 4		0,059	0,024	-0,03	-0,144	-0,163	-0,247	0,245	0,169	-0,156	1
	N	38	38	38	39	39	39	43	43	43	43

*Spearmanin korrelaatio p-arvo < 0,05

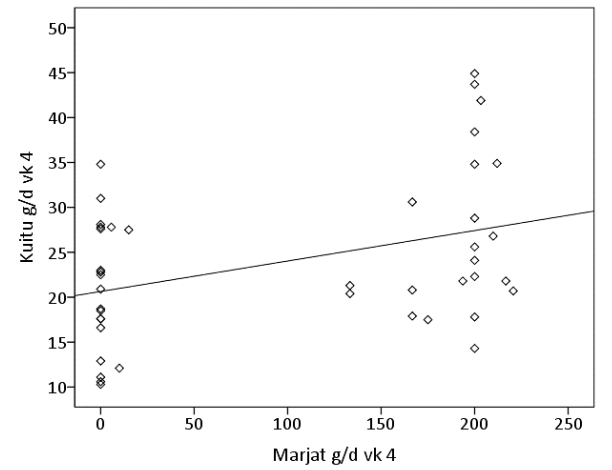
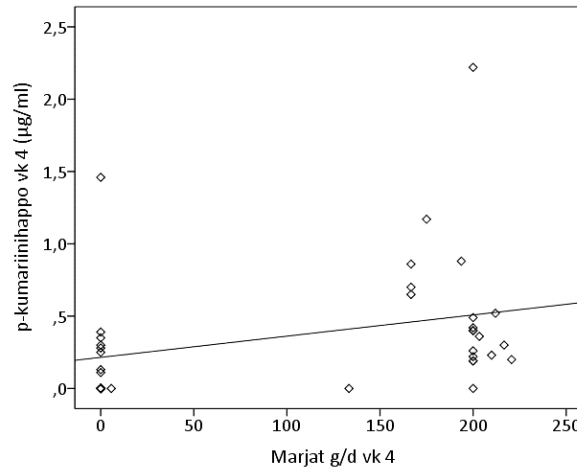
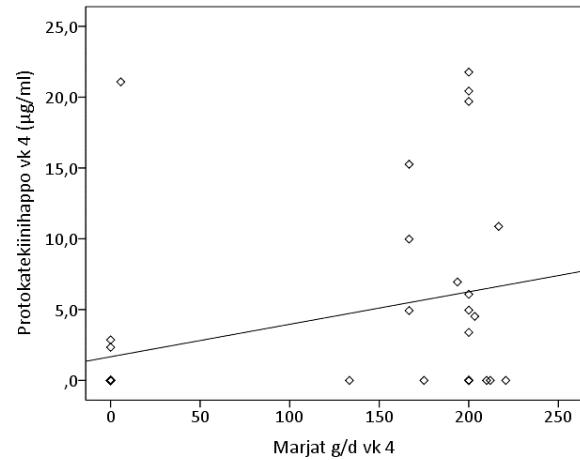
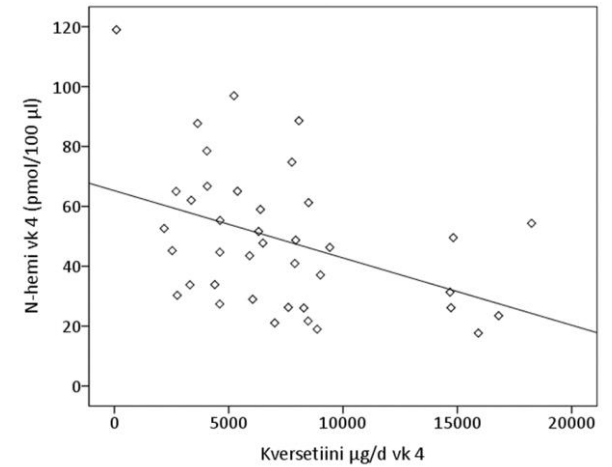
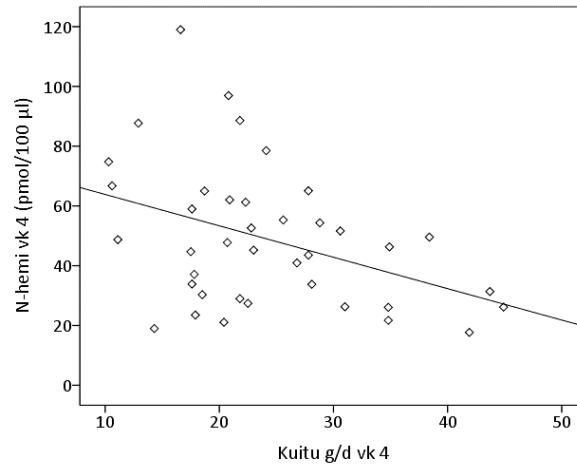
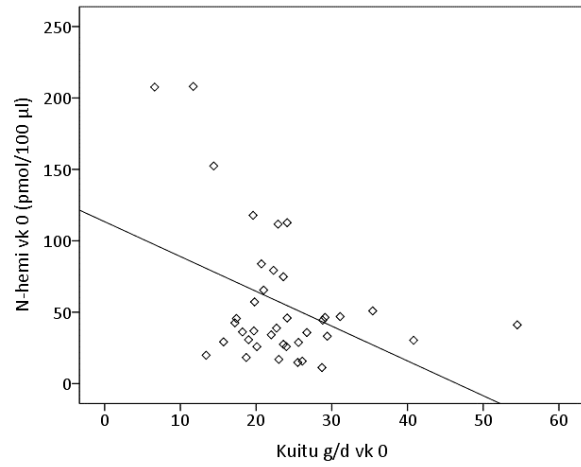
**Spearmanin korrelaatio p-arvo < 0,01

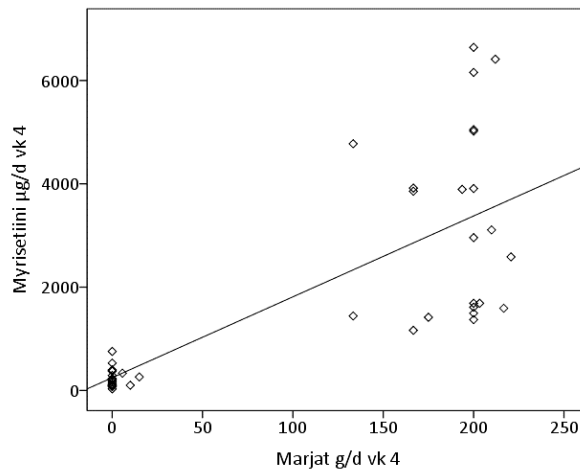
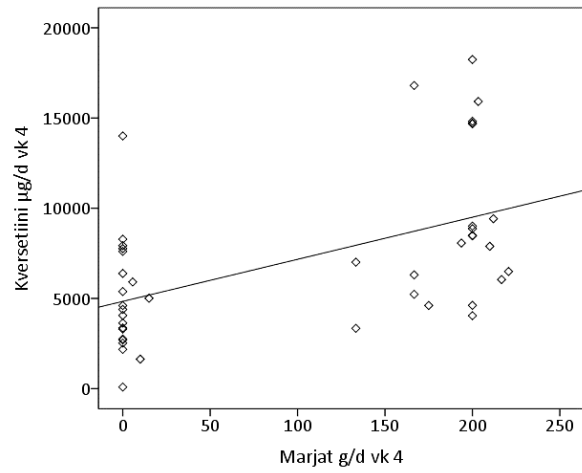
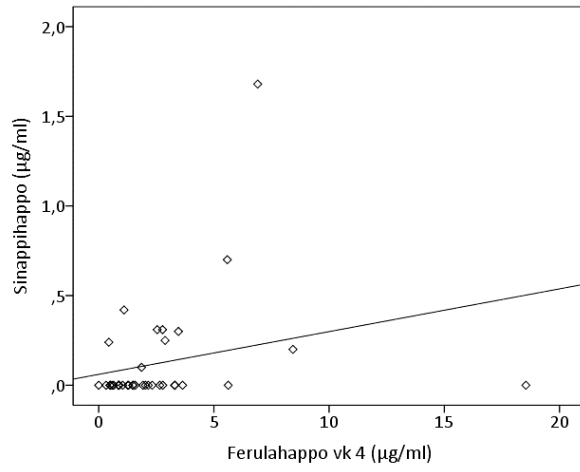
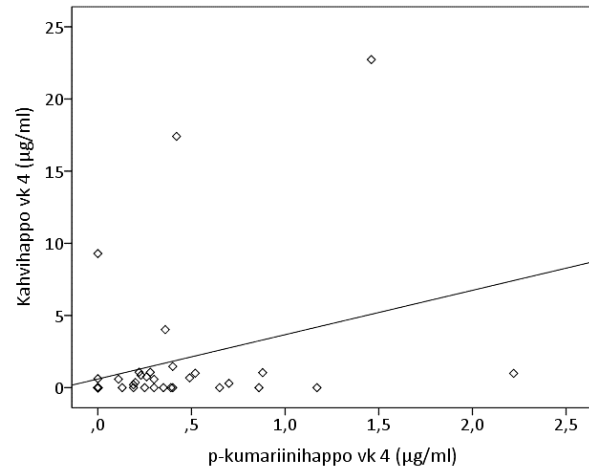
LIITE 9. Muuttujien välisiä korrelaatiokuvaajia

(1/3)



(2/3)





LIITE 10. N-nitrosoyhdisteiden ja ravintoaineiden välisiä korrelaatiotuloksia

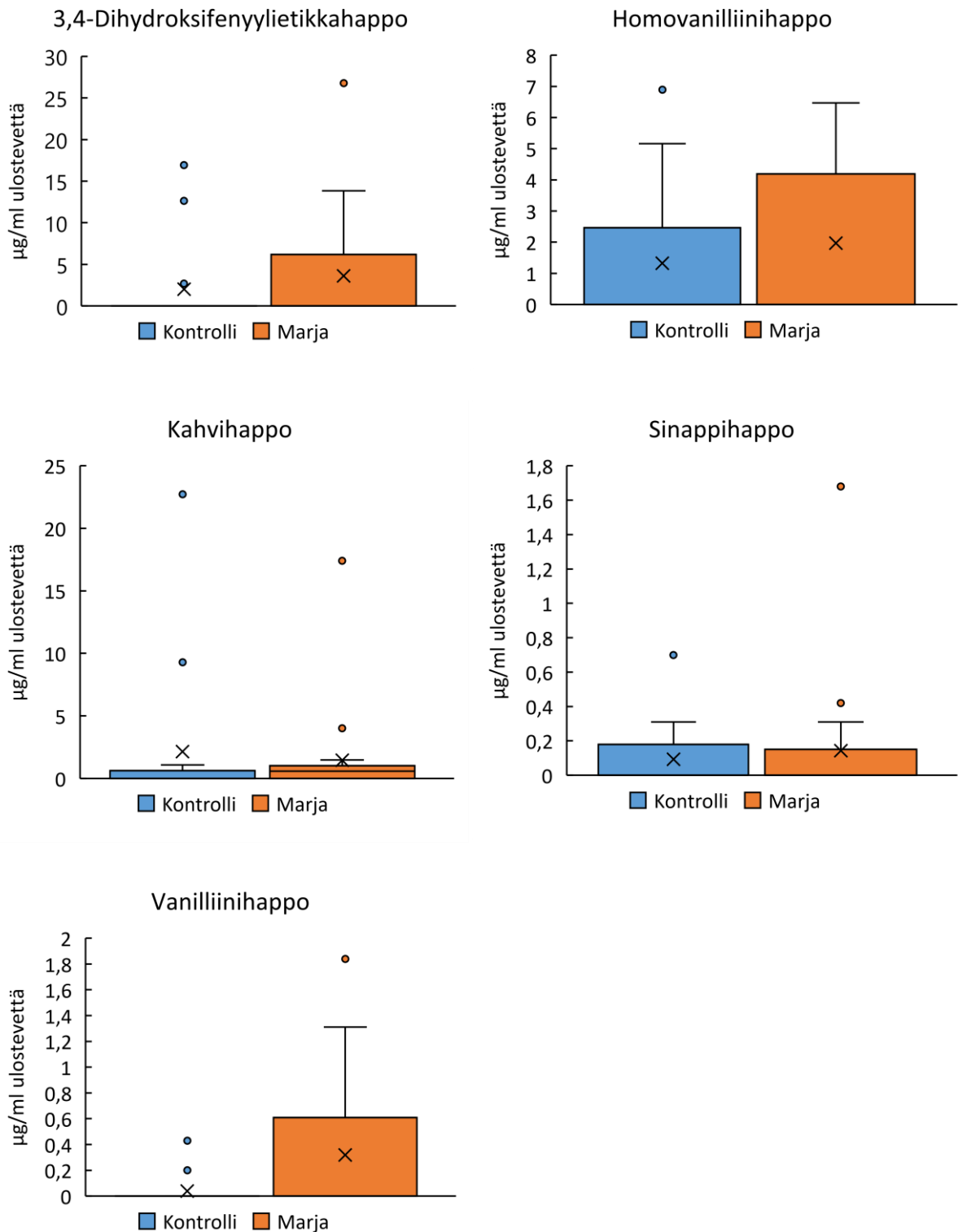
Taulukko. Spearmanin järjestyskorrelaatio rho, ρ , N-nitrosoyhdisteiden ja tiettyjen muuttujien välillä tutkimusviikoilla 0 ja 4.

Muuttuja	Tot NOC	N-tioli	N-hemi	Tot NOC	N-tioli	N-hemi
	vk 0 n=38	vk 0 n=38	vk 0 n=38	vk 4 n=39	vk 4 n=39	vk 4 n=39
Paino kg, vk 0	0,098	0,055	0,020	0,334*	0,317*	0,176
Paino kg, vk 4	0,084	0,043	0,018	0,333*	0,321*	0,159
Energia kJ, vk 0	-0,271	-0,277	-0,376*	-0,172	-0,167	-0,245
Rasva E%, vk 0	0,445**	0,462**	0,409*	-0,022	-0,04	0,126
Yksittäistydyttymättömät rh:t E%, vk 0	0,428**	0,446**	0,403*	-0,037	-0,043	0,068
Hiilihydraatti g, vk 0	-0,467**	-0,461**	-0,497**	-0,128	-0,110	-0,252
Hiilihydraatti E%, vk 0	-0,442**	-0,428**	-0,322*	0,042	0,083	-0,016
Monodisakkaridit g, vk 0	-0,465**	-0,447**	-0,536**	-0,201	-0,186	-0,335*
Monodisakkaridit E%, vk 0	-0,354*	-0,322*	-0,332*	-0,077	-0,048	-0,191
Tärkkelys g, vk 0	-0,378*	-0,387*	-0,361*	-0,019	0,001	-0,105
Kuitu g, vk 0	-0,250	-0,245	-0,224	-0,217	-0,168	-0,336*
Fruktoosi g, vk 0	-0,389*	-0,360*	-0,437**	-0,354*	-0,335*	-0,428**
Fruktoosi E%, vk 0	-0,346*	-0,304	-0,334*	-0,289	-0,279	-0,309
Vesiliukoinen polysakkaridi g, vk 0	-0,356*	-0,343*	-0,365*	-0,367*	-0,347*	-0,494**
A-vitamiini µg, vk 0	-0,282	-0,291	-0,365*	-0,370*	-0,315	-0,401*
Riboflaviini mg, vk 0	-0,345*	-0,379*	-0,432**	-0,168	-0,153	-0,173
Kalsium mg, vk 0	-0,250	-0,274	-0,329*	-0,147	-0,132	-0,233
Typpi g, vk 0	-0,256	-0,315	-0,414*	-0,066	-0,079	-0,130
Fosfori mg, vk 0	-0,314	-0,355*	-0,404*	-0,19	-0,173	-0,253
Kuitu g, vk 4	-0,003	-0,003	-0,028	-0,275	-0,257	-0,336*
Fruktoosi g, vk 4	-0,120	-0,118	-0,225	-0,273	-0,227	-0,477**
Tiamiini mg, vk 4	-0,107	-0,070	-0,056	-0,338*	-0,368*	-0,148
Rauta mg, vk 4	-0,157	-0,141	-0,116	-0,347*	-0,337*	-0,270
Kversetiini µg, vk 4	-0,083	-0,059	-0,175	-0,288	-0,312	-0,416**
3,4-Dihydroksifenyylietikkahappo, vk 4	-0,257	-0,221	-0,316	-0,326*	-0,349*	-0,237
	(n=36)	(n=36)	(n=36)	(n=37)	(n=37)	(n=37)
Sinappihappo, vk 4	-0,484**	-0,407*	-0,341*	-0,311	-0,318	-0,246
	(n=36)	(n=36)	(n=36)	(n=37)	(n=37)	(n=37)

*Spearmanin korrelaatio p-arvo < 0,05

**Spearmanin korrelaatio p-arvo < 0,01

LIITE 11. Polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien kuvaajia tutkimusryhmittäin



Kuva. Tutkimusryhmien polyfenolimetaboliittien pitoisuuksia ulostevedestä mitattuna. Sinisellä on kuvattu kontrolliryhmää ja oransilla marjaryhmää. Pitoisuudet µl/ml. Huomioi erisuuruiset Y-asteikot.