

Flavonoidien merkitys kasvien puolustusmekanismeissa ja niiden antimikrobiaalinen hyödyntäminen lääketieteessä

Ville Sannikka

LuK-tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun Yliopisto

Joulukuu 2022

Sisällysluettelo

1. Tiivistelmä	2
2. Johdanto.....	3
3. Flavonoidien rakenne	4
4. Flavonoidien biosynteesi	6
4.1. Fenyylipropanoidireitti	8
4.2. Malonyylikoentsyymi A:n muodostuminen	9
4.3. Flavonoidien pääsynteesireitti	9
5. Flavonoidit kasvien puolustuksessa.....	11
5.1. Valmiiksi muodostetut flavonoidit ja indusoidut flavonoidit.....	12
5.2. Flavonoidit biotottista stressiä vastaan.....	12
5.3. Flavonoidit abioottista stressiä vastaan.....	13
6. Flavonoidien antibakteeristen vaikutusten hyödyntäminen lääketieteessä.....	14
6.1. Flavonoidien antibakteeriset vaikutusmekanismit	15
6.1.1. Bakteerin soluseinän ja solukalvon muodostumisen inhiboiminen	15
6.1.2. Biofilmin muodostumisen inhiboiminen.....	16
6.1.3. Bakteerien tuottamien toksiinien inhiboiminen	16
6.1.4. Nukleiinihapposynteesin inhibointi	17
6.2. Flavonoidien ja antibioottien yhteisvaikutukset	17
7. Flavonoidien käytännön sovellukset antimikrobiaalisina aineina	19
8. Johtopäätökset ja pohdinta	20
8.1. Flavonoidien biosynteesi	20
8.2. Kasvien puolustusreaktiot	20
8.3. Flavonoidien lääketieteellinen merkitys	21
9. Lähdeluettelo	22

1. Tiivistelmä

Flavonoidit ovat kasveissa esiintyviä fenoliyhdisteitä. Flavonoidit koostuvat C₆ – C₃ – C₆-hiilirungosta, jossa on kaksi bentseenirengasta, joita yhdistää heterosyklinen pyraani. Flavonoidit voidaan rakenteen perusteella jakaa useisiin eri alaryhmiin, kuten flavoneihin isoflavoneihin ja antosyaaneihin. Flavonoidien hiilirunkoon voi sitoutua useita eri yhdisteitä, kuten aromaattisia happoja, jonka vuoksi erilaisia flavonoideja onkin tunnistettu yli 6000 kappaletta.

Flavonoidit ovat tärkeä osa kasvien puolustusreaktioita. Ne toimivat sekä abioottisia eli elottomia, että bioottisia eli elollisia stressejä vastaan. Flavonoidit suojaavat kasvia esimerkiksi UV-säteilyltä ja haitallisilta mikrobeilta. Flavonoidien on havaittu olevan hyvin antibakteerisiä yhdisteitä, minkä vuoksi niiden soveltamista lääketieteessä on tutkittu.

Tässä LuK-tutkielmassa selvitettiin flavonoidien merkitystä kasvien puolustusreaktioissa ja niiden hyödyntämistä lääketieteessä antimikrobiaalisina aineina. Tutkielmassa havaittiin, että flavonoideilla on potentiaalia toimia eri lääketieteen sovelluksissa bakteereja vastaan.

Flavonoideista muun muassa kversetiinin on todettu olevan erittäin antibakteerinen yhdiste, joka kykenee esimerkiksi inhiboimaan bakteerien nukleiinihapposynteesiä. Antibakteeristen ominaisuuksien hyödyntäminen on yksi mahdollinen ratkaisu antibioottiresistenttejä bakteerikantoja vastaan. Kversetiinin on havaittu estävän penisilliiniresistentin *Staphylococcus aureus* -bakteerin kasvua yhdessä antibioottien kanssa. Tämän lisäksi kversetiiniä sisältävien nanopartikkeleiden on havaittu tuhoavan patogeenisia bakteereita sekä *in vitro*- että *in vivo*-tutkimuksissa. Kversetiiniä on tutkittu myös polyamiditekstiileiden antibakteeristen ominaisuuksia parantamisessa.

Vaikka flavonoideilla on havaittu olevan potentiaalia toimia antibakteerisina aineina, niiden laajamittainen hyödyntäminen ei ole vielä toteutunut. Flavonoidien käyttöjen riskejä tulee arvioida vielä lisää ennen ihmiskokeita ja laajamittaista käyttöä. Vaikka nykyisen tutkimustiedon mukaan flavonoidit eivät aiheuta myrkytysreaktioita, lisätutkimus on silti tarpeen.

2. Johdanto

Kasveissa esiintyy valtavia määriä erilaisia aineenvaihdunta- eli metaboliatuotteita, jotka voidaan jakaa primäärisiin ja sekundäärisiin (Taiz ym. 2015). Primäärimetaboliatuotteet osallistuvat suoraan kasvien kehitykseen ja kasvuun. Taiz ym. (2015) mukaan primäärimetaboliatuotteita ovat esimerkiksi eri sokerit sekä aminohapot.

Sekundäärimetaboliatuotteet eivät vaikuta suoraan kasvien kehitykseen ja kasvuun, mutta ne toimivat esimerkiksi puolustusreaktiossa suojaen kasvia (Taiz ym., 2015). Singh ym. (2017) mukaan sekundäärimetaboliatuotteet ovat tärkeitä lääkeaineiden ja ruuan lisäaineiden lähteitä. Sekundäärimetaboliatuotteet voidaan jakaa kolmeen pääluokkaan: alkaloidi-, terpenoidi- ja fenolihdisteisiin (Taiz ym. 2015).

Flavonoidit kuuluvat kasveissa esiintyviin fenolihdisteisiin, joita esiintyy etenkin lehtien epidermissä ja hedelmien kuorissa (Górniak ym., 2018). Fenolihdisteet ovat varastoituina kasvisolun vakuoliin (Singh ym., 2017). Górniak ym. (2018) mukaan flavonoideja esiintyy kasveissa yleensä kaikissa sen elimissä, ja ne ovat kasvien sekundaarimetaboliatuotteista runsain ryhmä. Iwashinan (2000) mukaan ainoastaan kasvit kykenevät flavonoidisynteesiin, muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta. Muun muassa *Echinophora lamellosa* -koralli sekä *Aspergillus candidus* -sieni kykenevät tuottamaan flavonoideja (Iwashina 2000).

Flavonoidien jakautuminen ja flavonoidikoostumus vaihtelee eri kasvien ja kasvielimien välillä (Biharee ym., 2020). Vaihteluun vaikuttaa kasvin ravinteiden määrä, veden saatavuus, ympäristön kosteus, maaperän tyyppi, valon määrä ja voimakkuus sekä kasvin ikä (Biharee ym., 2020). Górniak ym. (2018) mukaan flavonoidien tuotannossa on eroavaisuuksia eri kasvilajeilla, mutta saman taksonin kasvit tuottavat samankaltaisia flavonoideja. Tämä viittaa siihen, että geeneillä on vaikutusta flavonoidisynteesiin (Górniak ym., 2018). Flavonoidit vaikuttavat kasveissa esimerkiksi eri osien väriytykseen ja juurinystryrän symbioosiin (Naik ym., 2022).

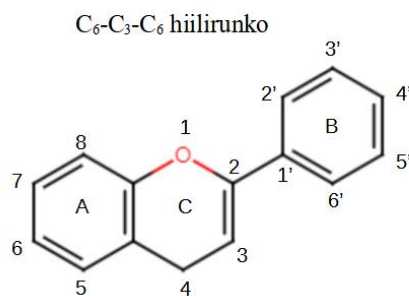
Treutterin (2005) mukaan flavonoideilla on useita vaikutuksia kasvien puolustusreaktiossa. Ne toimivat muun muassa abiottiselta eli elottomalta ja biottiselta eli elolliselta stressiltä suojaavina yhdisteinä. Abiottisiin stresseihin kuuluu esimerkiksi kylmyys, kuumuus, kuivuus ja UV-valo. Lisäksi flavonoidit voivat auttaa kasvia selviytymään maaperässä, jossa on myrkyllisiä metalleja (Treutter, 2005). Biottisiin stresseihin lukeutuu muun muassa kasveja ravintonaan käyttävät eliöt, bakteerit ja sienet (Treutter, 2005).

Monilla flavonoideilla on vahvoja antibakteerisia ominaisuuksia, jotka ilmenevät kasvien vastustuskykynä bakteereja vastaan (Górniak ym., 2018). Górniak ym. (2018) kirjoittaman artikkelin mukaan antibioottien laajamittaisen ja liiallisen käytön vuoksi antibioottiresistentit bakteerikannat ovat yleistyneet viime vuosina runsaasti. Antibioottiresistenttien bakteerikantojen vuoksi on tärkeää löytää uusia antibiootteja korvaavia hoitomuotoja (Górniak ym., 2018). Flavonoidien antibakteerisia ominaisuuksia voidaan soveltaa lääketieteessä ihmiselle patogeenisiä bakteereja vastaan (Biharee ym., 2020). Flavonoideilla on eri vaikutusmekanismi kuin antibiooteilla, minkä vuoksi bakteerit eivät kykene muodostamaan vastustuskykyä niitä vastaan yhtä helposti kuin antibiootteja vastaan (Biharee ym., 2020). Flavonoidien käyttö antibioottiresistenttien bakteerikantojen hoidossa on edelleen tutkimuksen kohteena (Biharee ym., 2020).

Tämän tutkielman tavoitteena on tarkastella flavonoidien merkitystä kasvien puolustusreaktioissa ja flavonoidien hyödyntämistä lääketieteessä. Tutkielmassa perehdytään etenkin siihen, miten flavonoideja voidaan käyttää antibioottien kanssa yhdessä antibioottiresistenttejä bakteerikantoja vastaan. Tutkielmassa tarkastellaan myös mitä käytännön sovelluksia on tutkittu, jossa flavonoidit toimivat antibakteerisena yhdisteenä. Lopuksi pohditaan myös flavonoiditutkimuksen tulevaisuutta ja mahdollisuuksia.

3. Flavonoidien rakenne

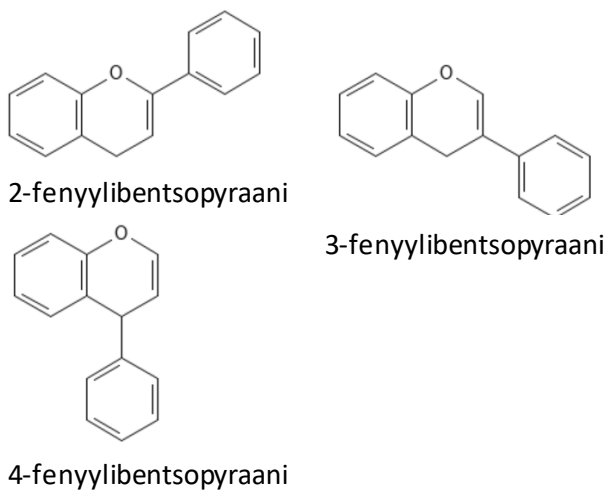
Flavonoidien rakenne muodostuu $C_6 - C_3 - C_6$ -hiilirungosta, jossa on kaksi bentseenirengasta (A & B, Kuva 1.), joita yhdistää heterosyklinen pyraani (C, Kuva 1.) (Biharee ym., 2020).



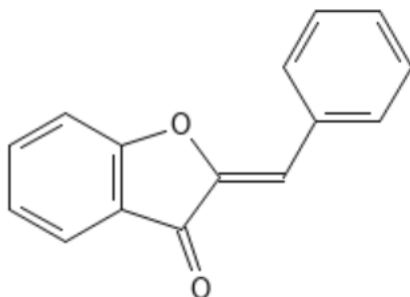
Kuva 1. Flavonoidien hiilirunko, mukailen Biharee ym. 2020

Flavonoidit voidaan jakaa eri alaryhmiin, kuten flavoneihin, isoflavoneihin, antosyaaneihin, katekiineihin sekä proantosyaaneihin. Flavonoideihin voi lisäksi sitoutua esimerkiksi aromaattisia happoja, sulfaatteja tai isoprenyyliryhmiä (Górniak ym., 2018). Monipuolisten alaryhmien sekä eri aineiden sitoutumisen vuoksi on tunnistettu yli 6000 erilaista flavonoidiyhdistettä (Singh ym., 2017). Kasveissa flavonoidit esiintyvät glykosideina, eli flavonoidiin on sitoutunut yksi tai useampia sokerimolekyylejä (Biharee ym., 2020).

Flavonoidit voidaan karkeasti jakaa neljään eri alaluokkaan riippuen siitä, mihin heterosyklisen pyraanin (C, Kuva 1.) hiileen toinen bentseenirengas (B, Kuva 1.) on sitoutunut (Biharee ym., 2020). Bentseenirengas voi sitoutua 2., 3., tai 4. hiileen, mikä vuoksi alaryhmät ovat nimetty 2-, 3- ja 4-fenyylibentsopyraaniksi (Kuva 2.) (Biharee ym., 2020). Näiden alaryhmien lisäksi on muitakin mahdollisia flavonoidirakenteita, kuten auronit (Kuva 3.), jotka eivät lukeudu edellä mainittuihin ryhmiin.



Kuva 2. Flavonoidien alaryhmät, mukailen Biharee ym. 2020



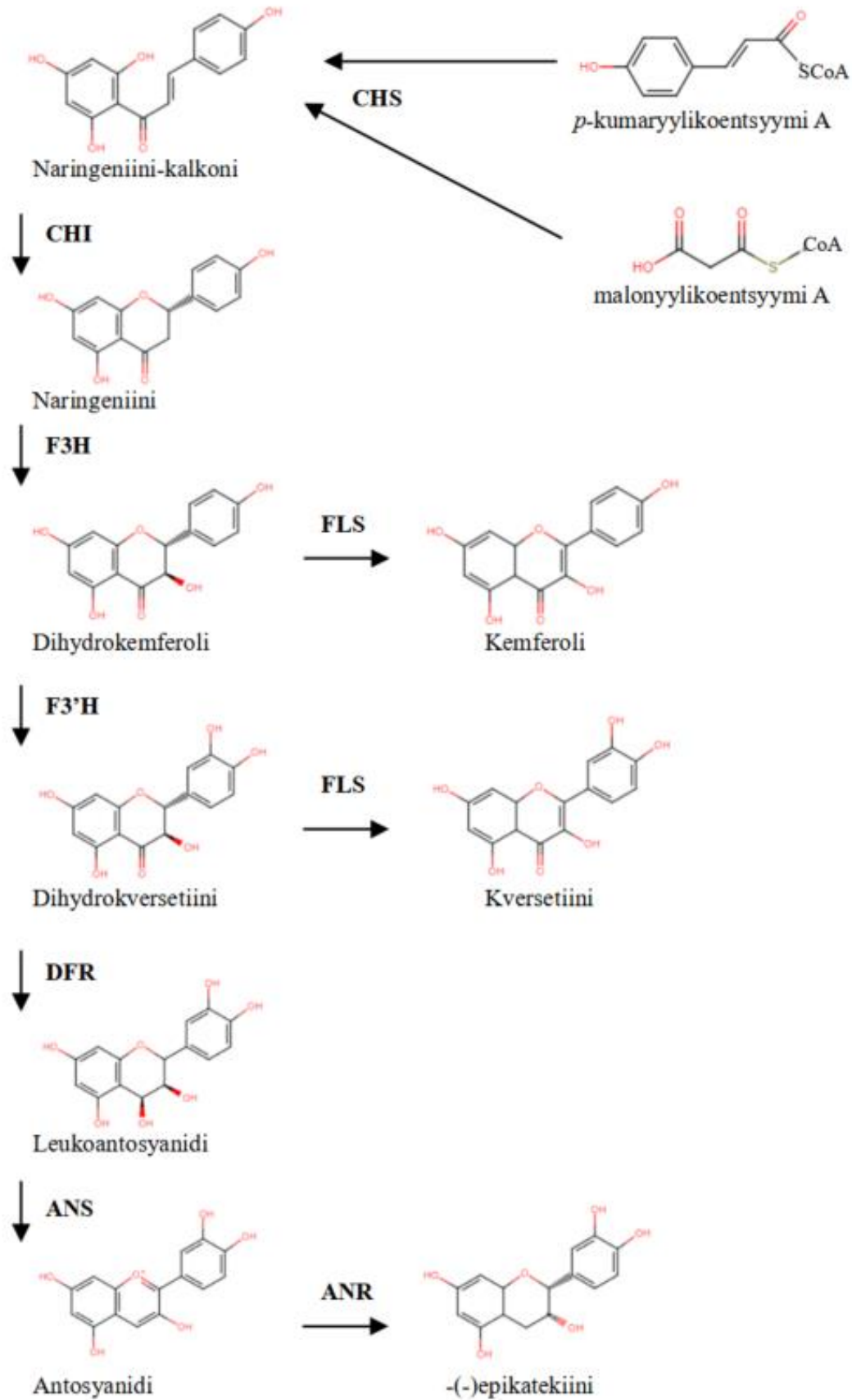
Kuva 3. Auronien rakenne, mukailen Biharee ym. 2020

4. Flavonoidien biosynteesi

Flavonoidien biosynteesiin vaikuttavat useat eri ympäristötekijät, kuten bioottinen ja abioottinen stressi (Naik ym., 2022). Kasvit säätelevät flavonoidien biosynteesiä transkription tasolla säätelemällä geenejä, jotka koodaavat pääsynteesireitin eri entsyymejä (Naik ym., 2022).

Lituruoho (*Arabidopsis thaliana*) on toiminut malliorganismina flavonoidien biosynteesin tutkimuksessa (Saito ym., 2013). Owens ym. (2008) mukaan lituruohon flavonoidien biosynteesi on melko yksinkertainen verrattuna moniin muihin korkeampiin kasveihin, sillä lituruoho tuottaa vain kolmen eri pääluokan flavonoideja, joita ovat flavonolit, antosyaanit ja proantosyaanit. Tässä tutkielmassa on käytetty lituruohoa esimerkkinä flavonoidien biosynteesin kuvaamisessa. Lituruohon flavonoidien biosynteesireitti on esitetty kuvassa 4.

Flavonoidien biosynteesin alussa ovat osallisena fenyylipropanoidi- ja polyketidireitit (Singh ym., 2017). Singh ym. (2017) mukaan fenyylipropanoidireitti tuottaa *p*-kumaryylikoentsyymi A:ta (engl. *p*-coumaroyl-CoA) ja polyketidireitti pidentää hiilirungon C2-ketjua käyttämällä malonyylikoentsyymi A:ta (engl. malonyl-CoA). Malonyylikoentsyymi A muodostetaan entsyymien avulla asetyylikoentsyymi A:sta (Saito ym., 2013).



Kuva 4. Flavonoidien biosynteesi, mukaillen Saito ym. 2013. Kuvan entsyymit: CHS=kalkonisyntetaasi, CHI=kalkoni-isomeraasi, F3H=flavanoni-3-hydroksylaasi, F3'H=flavonoidi 3'-hydroksylaasi, FLS=flavonolisyntetaasi, DFR=dihydroflavonoli 4-reduktaasi, ANS=antosyanidisyntetaasi, ANR=antosyanidireduktaasi.

4.1. Fenyylipropanoidireitti

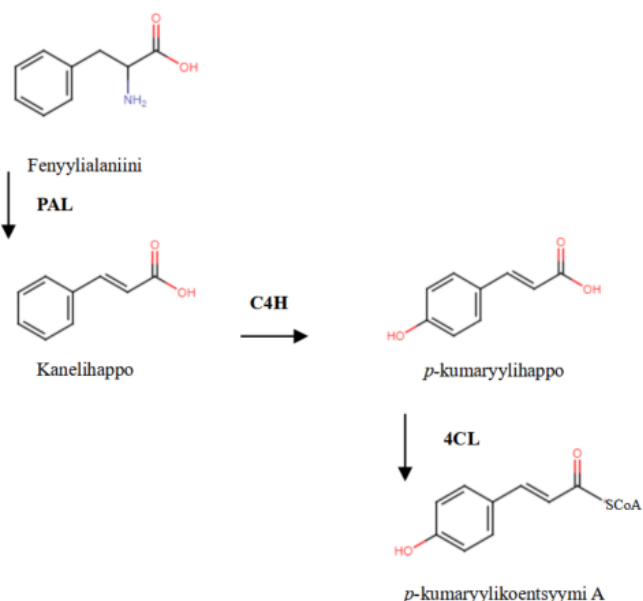
Saito ym. (2013) mukaan fenyylipropanoidireitillä fenyylialaniiniammoniumlyyaasi (PAL) on ensimmäinen entsyymi reaktiosarjassa, joka johtaa flavonoidien ja muiden yhdisteiden, kuten ligniinin ja lignaanin tuottoon. PAL-entsyymi katalysoi *trans*-kanelihapon muodostumista fenyylialaniinista (Saito ym., 2013). *Trans*-kanelihapon muodostuminen tapahtuu fenyylialaniinin deaminaatiolla eli aminoryhmän poistamisella (Li ym., 2015).

Saito ym. (2013) mukaan kanelihappo-4-hydroksylaasi (C4H) on seuraava entsyymi fenyylipropanoidireitillä. Heidän mukaansa C4H on sytokromi-P450-mono-oksygenaasi, joka katalysoi *trans*-kanelihapon hydroksylaatiota *p*-kumarihapoksi. Se muutetaan vielä *p*-kumaryylikoentsyymi A:ksi 4-kumaraatti-CoA-ligaasin (4CL) avulla, joka käyttää ATP:tä energialähteenä (Saito ym., 2013).

Li ym. (2015) tekemässä tutkimuksessa todettiin, että lituruoho käyttää 4CL-entsyymien neljästä eri isoformista (*At4CL1-At4CL4*) vain yhtä, *At4CL3*:a, flavonoidien synteesissä. Lituruohon *At4CL1*- ja *At4CL2*-entsyymien isoformeilla oletetaan olevan vaikutuksia ligniinien synteesissä (Li ym., 2015). Li ym. (2015) toteavat *At4CL4*-entsyymien toimivan eri reaktioissa kuin muiden 4CL-entsyymien.

Fenyylipropanoidireitin lopputuloksena saadaan *p*-kumaryylikoentsyymi A (Li ym., 2015).

Fenyylipropanoidireitti on havainnollistettu kuvassa 5.



Kuva 5. Fenyylipropanoidireitti, mukailten Li ym. 2015. Kuvan entsyymit: PAL=fenyylialaniiniammoniumlyyaasi, C4H=kanelihappo-4-hydroksylaasi, 4CL=4-kumaraatti-CoA-ligaasi.

4.2. Malonyylikoentsyymi A:n muodostuminen

Malonyylikoentsyymi A:n muodostumisessa tarvitaan asetyylikoentsyymi-A-karboksyylaasi-entsyymiä (ACC) (Saito ym., 2013). ACC-entsyymi koostuu kolmesta eri osasta, joita ovat biotiinikarboksyyli-kantajaproteiini (BCCP, engl. biotin carboxyl carrier protein), biotiinikarboksyylaasi (BC, engl. biotin karboxylase) ja karboksyyli transferaasi (CT, engl. carboxyltransferase) (Sasaki & Nagano, 2004). Sasaki & Naganon (2004) mukaan ACC-entsyymin toiminta on riippuvainen ATP:stä saatavasta energiasta ja Mg^{2+} -ioneista. ACC-entsyymin toimintaan vaikuttaa olennaisesti pH sekä magnesium-ionikonsentraatio (Sasaki & Nagano, 2004). ACC-entsyymin toiminta on korkeimmillaan, kun viherhiukkasten strooman pH on noin 8 ja Mg^{2+} -ionien konsentraatio on 2–5 mM (Sasaki & Nagano, 2004).

ACC-entsyymin katalysoimassa asetyylikoentsyymi A:n karboksylaatiassa on kaksi vaihetta (Saito ym., 2013). Sasaki & Naganon (2004) mukaan aluksi biotiinikarboksyylkantajaproteiiniin sitoutuu bikarbonaatti, jolloin muodostuu biotiinikarboksyylaasi. Tämän jälkeen biotiinikarboksyylaasi yhdistyy asetyylikoentsyymi A:n kanssa muodostaen malonyylikoentsyymi A:n (Sasaki & Nagano, 2004). Fenyylipropanoidireitillä muodostettu *p*-kumaryylikoentsyymi A yhdessä malonyylikoentsyymi A:n kanssa muodostavat flavonoidien biosynteesin esiasteet (Saito ym., 2013).

4.3. Flavonoidien pääsynteesireitti

Kaikkien flavonoidien biosynteesireitti alkaa kalkonisyntetaasi-entsyymillä (CHS) (Austin & Noel, 2002). CHS-entsyymi katalysoi triketidi-välituotteen muodostumista *p*-kumaryylikoentsyymi A:sta ja kolmesta malonyylikoentsyymi A -molekyylistä (Saito ym., 2013). Saito ym. (2013) mukaan triketidi-välituotteen spontaani renkaaksi muodostuminen johtaa naringeniini-kalkonin muodostumiseen. Singh ym. (2017) mukaan edellä mainittu kalkoni ei ole flavonoidisynteesissä lopputuotteena, vaan sen muodostumista seuraa vielä useita entsyymireaktiota, joiden myötä kasvit kykenevät monipuoliseen flavonoidisynteesiin.

Saito ym. (2013) mukaan CHS-entsyymin jälkeen flavonoidien synteesireitillä on seuraavaksi kalkoni-isomeraasi-entsyymi (CHI). CHI-entsyymi katalysoi naringeniini-kalkonin stereospesifiä rengasmuodostumista flavanoni (2S) -naringeniiniksi (Austin & Noel, 2002). Muodostunutta (2S) -naringeniiniä muokataan flavanoni-3-hydroksylaasi-entsyymillä (F3H) avulla dihydroflavonoliksi

(dihydrokemferoli) (Saito ym., 2013). F3H-entsyymi katalysoi (2S) -naringeniinin C-renkaan 3-kohdan hapetusta dihydrokemferoliksi, jonka sivutuotteena syntyy hiilidioksidia ja sukkiinaattia (Saito ym., 2013).

Dihydrokemferoli voidaan muokata dihydrokversetiiniksi flavonoidi 3'-hydroksylaasi-entsyymin (F3'H) avulla (Saito ym., 2013). Saito ym. (2013) mukaan F3'H-entsyymi on sytokromi-P450-mono-oksygenaasi, joka hydroksyloi dihydrokemferolin B-renkaan 3'-kohtaa (Saito ym., 2013).

F3'H-entsyymi voi dihydrokemferolin sijasta käyttää lähtöaineenaan myös kemferolia, jolloin lopputuotteena on kversetiini (Saito ym., 2013). Kversetiini sekä kemferoli muodostetaan flavonolisyntetaasi-entsyymin (FLS) avulla (Saito ym., 2013). FLS-entsyymi kilpailee dihydrokemferolista F3'H-entsyymin ja dihydroflavonoli 4-reduktaasi-entsyymin (DFR) (Owens ym., 2008).

DFR on ensimmäinen entsyymi reaktiosarjassa, joka johtaa antosyanidien syntymiseen (Saito ym., 2013). DFR-entsyymi katalysoi B-renkaassa 4-kohtaan muodostuneen ketonin pelkistämistä, joka johtaa leukoantosyanidin syntymiseen (Saito ym., 2013). Syntynyttä leukoantosyanidia käytetään antosyanidien valmistuksessa, jota katalysoi antosyanidisyntetaasi-entsyymi (ANS) (Saito ym., 2013). Saito ym. (2013) mukaan ANS-entsyymi muodostaa leukoantosyanidin kaksoissidoksen B-renkaaseen johtaen antosyanidin muodostumiseen. ANS-entsyymi käyttää leukoantosyanidin lisäksi happea ja alfaketoglutariihappoa lähtöaineina reaktiossa (Saito ym., 2013).

Proantosyanidien valmistamiseen antosyanideista tarvitaan antosyanidireduktaasi-entsyymi (ANR), joka pelkistää ANS-entsyymin muodostaman antosyanidin proantosyanidiksi (Saito ym., 2013). Proantosyanideihin kuuluu esimerkiksi (-) epikatekiini (Saito ym., 2013).

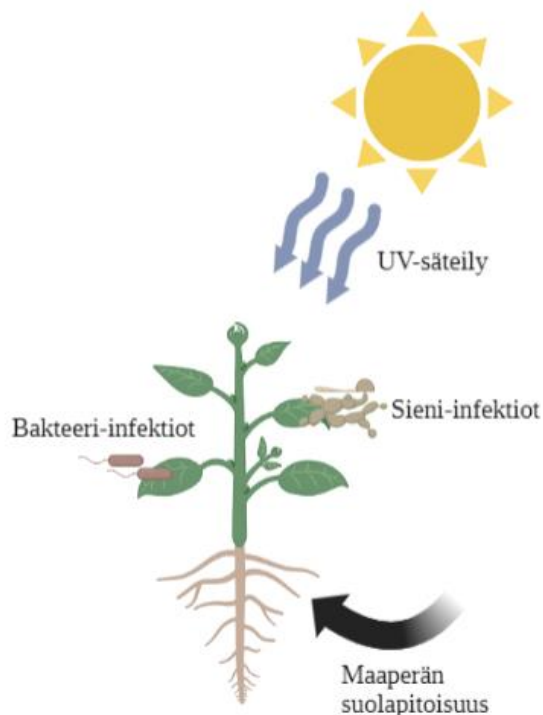
Flavonoideja voidaan muokata erittäin paljon erilaisilla entsyymeillä, kuten glykosyyli-, metyyli- ja asyyli- transferaaseilla. Ne mahdollistavat eri flavonoidiyhdisteiden suuren määrän (Saito ym., 2013).

5. Flavonoidit kasvien puolustuksessa

Treutter (2005) tuo esiin, että kasvien on täytynyt kehittää puolustusreaktioita erilaisia ympäristöjä vastaan, sillä kasvit eivät kykene liikkumaan suotuisamman ympäristön perässä. Kasvien kohtaamia abioottisia ja bioottisia stressejä on havainnollistettu kuvassa 6.

Koskimäki ym. (2008) mukaan flavonoidien merkitys kasvien puolustusreaktioissa vaihtelee eri kasvilajeilla. Esimerkiksi yksivuotisilla ruohokasveilla, joiden flavonoidipitoisuus on vähäinen, flavonoideilla ei ole suurta merkitystä puolustusreaktioissa (Koskimäki ym., 2008).

Kasvien puolustusreaktioiden lisäksi flavonoideilla on muitakin tehtäviä kasveissa (Treutter, 2005). Flavonoideja esiintyy muun muassa kasvien kukissa ja hedelmissä väriaineina ja hyönteisten sekä eläinten houkuttelijoina (Jaakola ym., 2004). Esimerkiksi punainen väritys kasvin lehdistä johtuu flavonoideista (Jaakola ym., 2004). Singh ym. (2017) mukaan flavonoidit ovat myös osallisena kasvien lisääntymisessä, siitepölyn itämisessä ja signaalimolekyyleinä kasvien ja mikrobien välisissä vuorovaikutuksissa.



Kuva 6. Kasvien kohtaamia abioottisia ja bioottisia stressejä.

5.1. Valmiiksi muodostetut flavonoidit ja indusoidut flavonoidit

Puolustusreaktioissa mukana olevat flavonoidit voidaan jakaa kahteen luokkaan: valmiiksi muodostettuihin flavonoideihin ja indusoituihin flavonoideihin (Treutter 2005). Valmiiksi muodostetut flavonoidit syntetisoidaan kasveissa osana normaalia kasvua (Treutter 2005). Treutter (2005) tuo ilmi artikkelissaan, että valmiiksi muodostetut flavonoidit sijaitsevat kasvin kannalta merkittävässä osassa, jossa ne toimivat puolustusreaktioissa suoraan tai signaalinvälittäjinä. Górnjak ym. (2018) kertovat flavonoidien keskittyneen lehtien suonien ympäristöön, jotta kasvi saa flavonoidit levitettyä tarvittaessa tehokkaasti, esimerkiksi patogeenin infektoidessa kasvin.

Treutter (2005) kuvailee indusoitujen flavonoidien syntetisoituvan vasteena abioottiselle tai bioottiselle stressille tai kasvin mekaaniselle vaurioitumiselle. Hänen mukaansa indusoituja flavonoideja voi esiintyä jatkuvasti kasvissa, mutta niiden tuotantoa lisätään kasvin joutuessa abioottisen tai bioottisen stressin kohteeksi.

5.2. Flavonoidit bioottista stressiä vastaan

Górnjak ym. (2018) mukaan flavonoidit suojaavat kasveja monia bioottisia stressinaiheuttajia, kuten kasvinsyöjiä ja mikrobeja, vastaan. Koskimäki ym. (2008) tutkivat flavonoidien vaikutusta mustikan (*Vaccinium myrtillus*) puolustusreaktioissa bioottista stressiä vastaan. He havaitsivat, että mustikalla flavonoidien synteesi kasvaa endofyyttisen bakteerin ja patogeenisen bakteerin infektion myötä. Molempien infektio nosti kversetiini-3-glukuronihappo-flavonoidin määrää kasvissa. Patogeenisellä bakteerilla infektoidut kasvit syntetisoivat myös muita flavonoideja, kuten epigallokatekiiniä. Koskimäki ym. (2008) havaitsivat myös proantosyaanien olevan varastoituna mustikkaan ja kasvin vaurioitumisen myötä aktivoituvan puolustusreaktioihin.

Isoflavoneihin kuuluvien pterokarpaanien on havaittu omaavan antimykoottisia, eli sienten kasvua inhiboivia vaikutuksia (Jiménez-González ym., 2007). Jiménez-González ym. (2007) kirjoittamassa artikkelissa todetaan pterokarpaanien olevan tärkeitä viljelykasveissa. Heidän mukaansa pterokarpaaneihin kuuluvat medikarpaani ja maakiaini kykenevät estämään kikherneessä (*Cicer arietinum*) esiintyvän patogeenisen sienen itämistä. Pterokarpaanit toimivat myös muissa hernekasveissa (*Fabaceae*) antimykoottisina yhdisteinä suojaten kasvia sieni-infektioilta (Jiménez-González ym., 2007). Pterokarpaaneja syntetisoidaan sieni-infektion

ympärillä olevissa soluissa ja ne kertyvät infektoituneisiin soluihin (Jiménez-González ym., 2007).

Pterokarpiinit ovat hyvin vahvasti antimykoottisia aineita. *In vitro* -tutkimuksissa pterokarpiinien on todettu inhiboivan patogeenisten sienten kasvua 50 %, kun pterokarpiinien pitoisuus on ollut 70 µg/l (Jiménez-González ym., 2007). Pterokarpiinit inhiboivat sienten kasvua täysin, kun niiden pitoisuus oli 200 µg/l (Jiménez-González ym., 2007). Jiménez-González ym. (2007) tuovat esiin, että antimykoottisten ominaisuuksien lisäksi pterokarpiinien on havaittu olevan antibakteerisia yhdisteitä.

5.3. Flavonoidit abioottista stressiä vastaan

Górniak ym. (2018) mukaan abioottisia stressejä kasveille ovat muun muassa kuivuus, kylmyys, kuumuus, maaperän suolapitoisuus sekä UV-valo. Flavonoidit toimivat UV-valoa vastaan absorboimalla haitallista UV-valoa suojaten kasvin lehtien ja varren sisempiä osia (Treutter, 2005). Treutter (2005) kertoo myös, että flavonoidit voivat toimia antioksidatiivisina yhdisteinä liiallista valoa vastaan.

Jaakola ym. (2004) havaitsivat UV-valolla olevan merkitystä mustikan flavonoideja koodaavien geenien aktiivisuuteen. UV-valossa kasvaneilla mustikan lehdillä oli myös korkeammat antosyaani-, katekiini- ja flavonolipitoisuudet verrattuna valolta suojattuihin lehtiin. Edellä mainituilla flavonoideilla on suojaavia vaikutuksia mustikan lehdissä, sillä ne absorboivat UV-valoa.

Shah ja Smith (2020) tuovat artikkelissaan esiin UV-B-valon vaikutuksia ohraan. UV-B-valossa kasvaneet ohrat sisälsivät merkittävästi enemmän kahta flavonoidia, saponariinia ja lutonariinia, kuin ilman UV-B-valoa kasvaneet ohrat (Schmitz-Hoerner & Weissenböck, 2003). Tulokset viittaavat siihen, että saponariinilla ja lutonariinilla on suojaavia vaikutuksia UV-B-valoa vastaan. Schmitz-Hoerner ja Weissenböck (2003) havaitsivat tutkimuksessaan myös, ettei ohran sirkkalehtien kasvu ja kehitys kärsinyt korkeasta UV-B-valosta.

Maaperän suolapitoisuus on merkittävä abioottinen stressi kasveille ja maaperän liiallinen suolapitoisuus voi rajoittaa kasvin kasvua (Shah & Smith, 2020). Liiallinen suolapitoisuus aiheuttaa fotosynteesin ja raviteiden saannin heikkenemistä sekä solun metabolian muuttumista (Ismail ym., 2016). Liiallinen suolapitoisuus, etenkin natriumionit (Na^{2+}), johtavat

reaktiivisten happiradikaalien (ROS) syntymiseen. Reaktiiviset happiradikaalit aiheuttavat vaurioita muun muassa DNA:han, proteiineihin ja pigmentteihin (Ismail ym., 2016).

Ismail ym. (2016) tekemässä tutkimuksessa todettiin rutiinin olevan merkittävä yhdiste kvinoan (*Chenopodium quinoa*) suolankestävyydessä. He totesivat rutiinin määrän nousevan 25-kertaisesti kasvin ollessa suolapitoisemmassa kasvuympäristössä. Rutiinin havaittiin vaikuttavan kaliumionien (K⁺) säilymiseen soluissa sekä poistavan Na²⁺-ioneja mesofyllin soluista (Ismail ym., 2016). Tämän todettiin ylläpitävän parempaa kalium- ja natriumionien välistä suhdetta soluissa, mikä nostaa solujen suolankestävyyttä (Ismail ym., 2016). Ismail ym. (2016) totesivat tutkimuksessaan, että rutiini saattaa myös estää hydroksyyli-radikaalien syntymistä soluissa.

Flavonoideista myös antosyaanin on todettu toimivan suolapitoisuudesta aiheutuvaa stressiä vastaan (Shah & Smith, 2020). Shahin ja Smithin (2020) mukaan antosyaanit toimivat suolapitoisuudesta aiheutuvaa stressiä vastaan muun muassa riisissä (*Oryza sativa*).

6. Flavonoidien antibakteeristen vaikutusten hyödyntäminen lääketieteessä

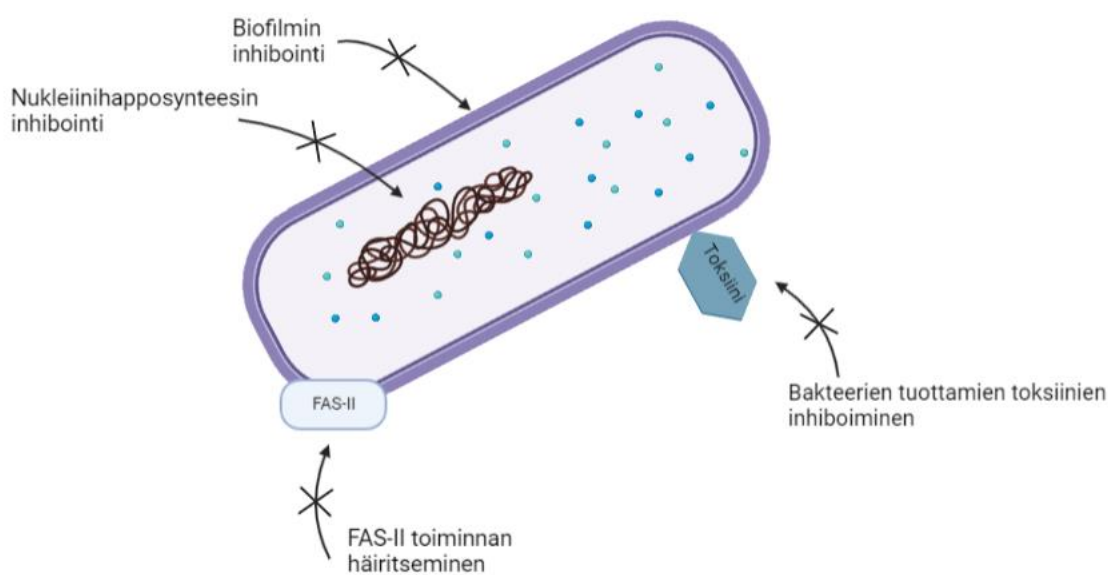
Flavonoidien ja muiden luonnosta löytyvien yhdisteiden hyödyntäminen antibakteerisina aineina lääketieteessä on nykyaikana tärkeää, sillä antibioottien liikkakäytön myötä antibiootit ovat menettämässä tehoaan (Saleem ym., 2010). Górnjak ym. (2018) mukaan antibioottien liikkakäyttöä esiintyy etenkin maataloudessa.

Saleem ym. (2010) mukaan bakteerit kykenevät hankkimaan resistenssin antibiootteja vastaan usealla eri tavalla, joten ongelmaan on hankala löytää ratkaisua. Durão ym. (2018) kertovat, että bakteerit voivat saada antibioottiresistenssin joko mutaatioiden avulla tai horisontaalisen geenisiirtymän (engl. horizontal gene transfer, HGT) avulla. Useilla bakteereilla antibioottiresistenssin kehittymisen todennäköisyys kasvaa, jos niitä vastaan käytettävää antibioottia käytetään alle sen määrän, joka johtaisi bakteerin kuolemaan (Durão ym., 2018).

Saleem ym. (2010) mukaan antibioottiresistenssiongelmaa kasvattaa lisäksi se, ettei uusia antibiootteja ole tullut markkinoille paljoa. Uusien antibioottien vähyyden vuoksi lääketutkimus hakee ratkaisua luonnosta löytyvien yhdisteiden, kuten flavonoidien, avulla (Saleem ym., 2010).

6.1. Flavonoidien antibakteeriset vaikutusmekanismit

Biharee ym. (2020) mukaan flavonoideilla on useita antimikrobiaalisia vaikutusmekanismeja. Flavonoidit kykenevät esimerkiksi estämään solukalvon, soluseinän ja biofilmin muodostumista sekä inhiboimaan bakteerien tuottamia toksiineja (Kuva 7.) (Biharee ym., 2020). Flavonoidit kykenevät myös inhiboimaan bakteerien nukleiinihapposynteesiä, mikä johtaa bakteerin kuolemaan (Biharee ym., 2020). Lisäksi flavonoideilla on paljon muitakin antimikrobiaalisia vaikutusmekanismeja, mutta niiden suuren määrän vuoksi keskityn vain edellä mainittuihin.



Kuva 7. Flavonoidien antimikrobiaalisia vaikutusmekanismeja, mukaillen Biharee ym. 2020. FAS-II=rasvahapposyntaasi II.

6.1.1. Bakteerin soluseinän ja solukalvon muodostumisen inhiboiminen

Biharee ym., (2020) artikkelissa tuodaan esille, miten flavonoidit kykenevät inhiboimaan etenkin gram-negatiivisten bakteerien soluseinän ja -kalvon normaalia toimintaa. Heidän mukaansa gram-negatiivisilla bakteereilla FAS-II (rasvahapposyntaasi II) -reitti on tärkeä osa soluseinän ja -kalvon muodostumista. FAS-II:ta inhiboimalla voidaan estää bakteerin soluseinän ja -kalvon muodostuminen (Biharee ym., 2020).

Zhang ym. (2008) havaitsivat kolmen flavonoidin, kversetiinin, apigeniinin ja (S)-sakurateenin, vaikuttavan *Helicobacter pylori* -bakteerilajin FAS-II-reitiltä löytyvään kantajaproteiiniin (β -hydroxyacyl-acyl -proteiini). Heidän löydösten mukaan kyseiset flavonoidit kilpailevat

sitoutumisesta kantajaproteiiniin estäen sen toiminnan. Tämä johtaa siihen, ettei FAS-II toimi ja bakteerin soluseinän ja -kalvon synteesi estyy (Biharee ym., 2020).

6.1.2. Biofilmin muodostumisen inhiboiminen

Bakteerien biofilmi on ohut, mutta hyvin kestävä rakenne (Biharee ym., 2020). Bakteerit kiinnittyvät biofilmin avulla esimerkiksi ihmisen kudoksiin tai lääketieteellisiin instrumentteihin, kuten kanyyleihin (Biharee ym., 2020). Kehittynyttä biofilmiä on hankala hajottaa, minkä vuoksi biofilmin ympäröimää bakteerikasvustoa on haastavaa tappaa (Biharee ym., 2020).

Biharee ym. (2020) mukaan hydrofiilisten flavonoidien avulla voidaan vaikuttaa biofilmin muodostumiseen ja bakteerien kiinnittymiseen biofilmin avulla. Biharee ym. (2020) kertovat, että hydrofiiliset flavonoidit vaikuttavat eri tavoin biofilmiin. Heidän mukaansa flavonoideilla on vaikutuksia biofilmin kehittymiseen ja niiden avulla voidaan myös tuhota biofilmin suojassa kasvava bakteerikasvusto. Biharee ym. (2020) luettelevat biofilmiin vaikuttavien flavonoidien olevan muun muassa naringeniini, negletini ja apigeniini. Heidän mukaansa naringeniini ja apigeniini vaikuttavat *Escherichia coli* -bakteeria vastaan ja negletini vaikuttaa *Staphylococcus aureus* -bakteeria vastaan.

6.1.3. Bakteerien tuottamien toksiinien inhiboiminen

Biharee ym. (2020) tuo ilmi, että bakteerit tuottavat kahdenlaisia myrkyllisiä yhdisteitä, endotoksiineja ja eksotoksiineja. Biharee ym. (2020) mukaan endotoksiinit ovat gram-negatiivisten bakteerien uloimmassa soluseinässä esiintyviä polysakkarideja ja eksotoksiinit ovat bakteerien erittämiä yhdisteitä.

Beruben ja Wardenburgin (2013) mukaan *Staphylococcus aureus* -bakteerin tuottamista eksotoksiineista etenkin α -hemolyysi eli α -toksiini aiheuttaa ihon nekroosia ja tappavan infektion. Beruben ja Wardenburgin (2013) mukaan α -toksiini erittyy veteen liukenemiskykyisenä monomeerinä, joka isäntäsolun solukalvolla sitoutuu heptametrisiksi rakenteeksi. Isäntäsolussa α -toksiini aiheuttaa muun muassa solukalvon hajoamista, huokosten syntymistä, solusignaalintireittien muuttumista sekä sytokiinin eritystä (Berube & Wardenburg, 2013).

Koska bakteerien toksiinien ovat avainasemassa infektioiden muodostumisessa, on niitä vastaan tärkeää kehittää lääkkeitä (Biharee ym., 2020). Flavonoideista epikatekiinigallaatin (EKG) on havaittu kykenevän estämään α -toksiinin erityksen (Shah ym., 2007).

Shah ym. (2007) tekemässä tutkimuksessa EKG:n havaittiin vähentävän MRSA:n (metisilliini-resistentti *Staphylococcus aureus*) α -toksiinin muodostumista. Toksiinia muodostui 75–99 % vähemmän, kun EKG:n pitoisuus oli 25 $\mu\text{g/ml}$. (Shah ym., 2007). Shah ym. (2007) mainitsee, että EKG:a ja vastaavanlaisia flavonoideja voidaan mahdollisesti hyödyntää MRSA-infektion hoidossa. Biharee ym. (2020) mukaan myös muun muassa apigeniinillä, fisetiinillä ja kversetiinillä on bakteerien toksien toiminnan estämiseen vaikuttavia ominaisuuksia.

6.1.4. Nukleiinihapposynteesin inhibointi

Flavonoidit kykenevät myös inhiboimaan nukleiinihapposynteesiä (Biharee ym., 2020). Flavonoideista kversetiini voi inhiboida prokaryoottien DNA:n replikaatiossa toimivaa DNA-gyraasia (Biharee ym., 2020). DNA-gyraasin inhiboiminen on potentiaalinen kohde uusille antibakteerisille lääkkeille, sillä sen toimintaa inhiboimalla voidaan aiheuttaa DNA:n hajoamista (Plaper ym., 2003). Plaper ym. (2003) havaitsivat tekemässään tutkimuksessa kversetiinin kilpailevan ATP:n kanssa sitoutumisesta DNA-gyraasin B-alayksikköön inhiboiden sen toimintaa. Plaper ym. (2003) toivat esiin tutkimuksessaan myös toisen kversetiinin vaikutusmekanismin bakteerien nukleiinihapposynteesin inhibitioon. Heidän mukaansa kversetiini sitoutuu DNA:han, mikä aiheuttaa DNA-gyraasin stabiloitumisen. Tämä johtaa DNA:n hajoamiseen (Plaper ym., 2003). Biharee ym. (2020) mukaan myös muun muassa kemferolilla ja apigeniinillä on inhibiittorisia vaikutuksia bakteerien nukleiinihapposynteesiin.

6.2. Flavonoidien ja antibioottien yhteisvaikutukset

Flavonoidit voivat myös yhdessä antibioottien kanssa vaikuttaa muun muassa bakteerien soluseinän rakenteeseen ja solujen jakautumiseen (Eumkeb ym., 2010). Flavonoideja on tutkittu etenkin MRSA:ta vastaan, sillä siitä on kehittynyt useille lääkkeille resistenttejä (multiple drug resistant) (MDR) kantoja, jotka uhkaavat ihmispopulaatioita ympäri maailman (Mun ym., 2013).

Stapleton ym. (2004) tekemän tutkimuksen mukaan EKG yhdessä oksasilliinin kanssa on tehokas MRSA:ta vastaan. Heidän artikkelissansa selvitettiin, että EKG kykenee yhdessä beetalaktaameihin kuuluvan oksasilliinin kanssa kumoamaan beetalaktaami-resistenssin MRSA:ssa. EKG:n lisäksi muilla katekiinijohdannaisilla on beetalaktaamien kanssa vastaavia vaikutuksia MRSA:ta vastaan (Stapleton ym., 2004).

Mun ym. (2013) tutkivat kurkumiinin ja eri antibioottien yhteisvaikutuksia MRSA:ta vastaan. Tutkimuksessa käytettiin antibiootteina oksasilliiniä, ampisilliiniä, siprofloksasiiniä sekä norfloksasiiniä. Kurkumiinin pienin MRSA:n kasvua inhihoiva konsentraatio (engl. minimum inhibitory concentration) (MIC) oli 125–250 µg/ml, riippuen MRSA-kannasta (Mun ym., 2013). Oksasilliinillä, johon Mun ym. (2013) tutkimus paneutui tarkemmin, MIC-luvut olivat 125–1000 µg/ml.

Kun kurkumiinia ja oksasilliiniä käytettiin yhdessä, bakteerikasvustot saatiin tuhottua hyvin (Mun ym., 2013). Parhaat tulokset saatiin, kun kurkumiinia käytettiin ½-¾ sen MIC-määrästä ja oksasilliiniä ½ sen MIC-määrästä. Näitä määriä käyttämällä MRSA saatiin tuhottua kokonaan 24 tunnin aikana (Mun ym., 2013). Kurkumiini osoitti tutkimuksessa merkittäviä yhteisvaikutuksia antibioottien kanssa.

Eumkeb ym. (2010) tutkivat flavonoidien ja antibioottien yhteisvaikutuksia penisilliiniresistenttiä *Staphylococcus aureus* (PRSA) vastaan. Heidän tekemän tutkimuksen mukaan galangiini-, kversetiini- ja baikaliini-flavonoideilla on havaittu olevan yhteisvaikutuksia antibioottien kanssa. Keftatsidiimi-antibiootin ja edellä mainittujen flavonoidien yhteiskäyttö vähensi huomattavasti PRSA:n pesäkkeen muodostavien yksikköjen (pmy, engl. colony forming units, cfu) määrää (Eumkeb ym., 2010). Eumkeb ym. (2010) mukaan keftatsidiimi 20 µg/ml pitoisuudessa ei vähentänyt PRSA:n määrää merkittävästi ilman flavonoideja. Galangiini, kversetiini ja baikaliini 50 µg/ml pitoisuudessa eivät myöskään vähentäneet huomattavasti PRSA:n määrää ilman keftatsidiimiä (Eumkeb ym., 2010). Kun flavonoideja ja keftatsidiimiä lisättiin kasvatusalustaan yhdessä molempia 5 µg/ml, väheni PRSA:n pesäkkeen muodostavat yksiköt 5000-kertaisesti kuuden tunnin aikana (Eumkeb ym., 2010). Yhdessä flavonoidit ja antibiootit olivat tehokkaampia kuin erikseen PRSA:ta vastaan.

7. Flavonoidien käytännön sovellukset antimikrobiaalisina aineina

Flavonoideista kversetiinillä on todettu olevan mahdollisuuksia lääketieteen käytännön sovelluksiin. Sun ym. (2015) tekemän tutkimuksen mukaan kversetiiniä sisältävät PLGA (poly l-lactide-co-glycolide) -nanopartikkelit ovat tehokkaita *Escherichia coli*- ja *Micrococcus tetragenus* -bakteereja vastaan sekä *in vitro*- että *in vivo*-tutkimuksissa. Sun ym. (2015) mukaan nanopartikkien käyttö lääketieteessä on todettu olevan tehokas eri mikro-organismeja vastaan. Heidän mukaansa PLGA-nanopartikkeleihin voidaan hyvin sisällyttää antibakteerisia yhdisteitä, kuten kversetiiniä, ja tätä yhdistelmää voidaan käyttää bakteeri-infektioita vastaan.

PLGA-nanopartikkelien havaittiin aiheuttavan mekaanisia vaurioita Sun ym. (2015) tutkimuksessa käytetyissä bakteereissa solukalvon rakenteisiin. Näiden vaurioiden kautta solunsisäiset materiaalit pääsivät vuotamaan pois soluista aiheuttaen solun hajoamisen (Sun ym., 2015).

PLGA-nanopartikkelit ovat *in vivo*-tutkimuksissa osoittautuneet myös turvalliseksi, sillä ne eivät aiheuttaneet merkittäviä elinvaurioita hiirille (Sun ym., 2015). Sun ym. (2015) tekemässä tutkimuksessa todettiin myös, etteivät nanopartikkelit aiheuttaneet hiirillä poikkeuksellisia oireita eikä muutosta esimerkiksi painossa. PLGA-nanopartikkelit eivät myöskään aiheuttaneet hiirissä myrkytysoireita (Sun ym., 2015).

Kversetiini on todettu hyödylliseksi yhdisteeksi myös polyamiditekstiileissä, kuten kasvomaskeissa ja erilaisissa sairaalatekstiileissä (Li ym., 2019). Li ym. (2019) tekemässä tutkimuksessa selvitettiin kolmen eri flavonoidin, baikaliinin, kversetiinin sekä rutiinin hyödyntämistä polyamidista valmistettujen tekstiilien antibakteeristen ominaisuuksien parantamisessa. Tutkimuksessa todettiin, että kversetiini toimii parhaiten polyamidin kanssa, sillä se imeytyi hyvin kankaaseen ja oli antibakteerisin tutkituista flavonoideista. Lisäksi kversetiini kesti parhaiten kankaan pesua (Li ym., 2019). Li ym. (2019) artikkelissa todettiin baikaliinilla ja rutiinilla olevan hyviä antimikrobisia ominaisuuksia, mutta niiden imeyttäminen polyamidikankaaseen oli työläämpää eivätkä ne olleet yhtä pesunkestäviä kuin kversetiini. Näistä syistä kversetiinin todettiin olevan kustannustehokkain vaihtoehto (Li ym., 2019).

Flavonoideja on tutkittu myös mahdollisina desinfiointiaineina. Ruuanlaitossa ja -säilytyksessä käytettävien välineiden desinfiointi on tärkeää elintarvikeperäisten tautien ehkäisyssä (Wu ym.,

2019). Muun muassa *Staphylococcus aureus* -bakteerin on todettu voivan aiheuttaa ruokamyrkytyksiä ja MRSA aiheuttaa vakavan riskin ihmisille (Wu ym., 2019).

Wu ym. (2019) tekemässä tutkimuksessa todettiin lakritsista eristetyn flavonoidin, glabrolin, kykenevän tuhoamaan MRSA:n muovisesta sekä ruostumattomasta teräksestä valmistetuista rasioista. Glabroli tuhosi MRSA:n vaikuttamalla sen solukalvoon (Wu ym., 2019).

Wu ym. (2019) tutkimuksessa havaittiin glabrolin tuhoavan MRSA:n 15 minuutissa sen ollessa 16–64 µg/ml konsentraatiossa ja yhdessä tunnissa glabrolin ollessa 8 µg/ml konsentraatiossa. Glabroli voisi tutkimuksen mukaan soveltua keittiövälineiden desinfiointiaineeksi sen tehokkuuden vuoksi ja turvallisuuden vuoksi. Glabroli ei aiheuttanut merkittäviä toksisia reaktioita nisäkkään soluja vastaan (Wu ym., 2019).

8. Johtopäätökset ja pohdinta

8.1. Flavonoidien biosynteesi

Flavonoidien biosynteesi on hyvin monivaiheinen reaktiosarja, joka yksinkertaisimmillaankin koostuu useasta eri entsyymistä ja reaktiosta. Tunnettuja flavonoideja on yli 6000, joten biosynteesin tulee olla hyvin muovautumiskykyinen. Kuten lituruohon pääbiosynteesireittiä tarkasteltaessa todettiin, samasta yhdisteestä voidaan eri entsyymien avulla rakentaa montaa eri flavonoidiyhdistettä. Saman lähtöaineen käyttäminen eri flavonoidien muodostamiseen mahdollistaa kasvien resurssien säästämisen.

Flavonoidien biosynteesireitin tutkimus on tärkeää, jotta voidaan ymmärtää, miten flavonoidit muodostuvat kasveissa. Biosynteesireitin tuntemisella voitaisiin tutkia keinoja tehostaa tiettyjen flavonoidien biosynteesiä. Biosynteesiä tehostamalla flavonoidien käyttö esimerkiksi lääketieteen sovelluksissa voisi tulla taloudellisesti kannattavaksi, sillä pienemmällä määrällä kasveja saataisiin tuotettua suurempi määrä haluttuja flavonoideja.

8.2. Kasvien puolustusreaktiot

Flavonoidit vaikuttavat moniin kasvien abioottisiin ja bioottisiin stresseihin. On kiehtovaa, miten moneen eri asiaan samat yhdisteet voivat vaikuttaa. Esimerkiksi antosyaanien

vaikutukset sekä UV-valon sietokykyyn että bakteereja vastaan toimimiseen ovat mielenkiintoisia, sillä kyseessä on kaksi hyvin erilaista stressilähdettä. On myös mielenkiintoista, miten kasvit tuottavat erilaisia flavonoideja bakteereja ja sieniä vastaan.

Shah ja Smith (2020) kertovat artikkelissaan ilmastonmuutoksen aiheuttavan muutoksia elinympäristöihin, jotka aiheuttavat stressiä kasveille. He tuovat esiin, että ilmastonmuutoksen edetessä abioottiset stressit, kuten kuivuus ja maaperän suolaisuus kasvavat tulevaisuudessa. Flavonoidien merkityksen ymmärtäminen edellä mainittujen stressien siedossa on siis tärkeää tietoa. Tulevaisuudessa voitaisiin tutkia, miten tärkeisiin viljelykasveihin voitaisiin saada tuotettua lisää flavonoideja, jotka auttavat kasveja selviytymään muuttuvissa ja haastavissa olosuhteissa. Mahdollisia tutkimushankkeita voisivat olla myös flavonoidien käyttäminen luonnollisina puolustusaineina viljelykasveja vaurioittavia mikrobeja ja kasvinsyöjiä vastaan.

8.3. Flavonoidien lääketieteellinen merkitys

Tutkielmassa havaitsin, että flavonoideista etenkin kversetiinillä on potentiaalia toimia lääketieteessä antibakteerisena yhdisteenä. Kversetiini toistui useaan kertaan Biharee ym. (2020) tekemässä artikkelissa, jossa tutkittiin flavonoidien merkitystä anti bakteerisina aineina. Sun ym. (2015) tutkimuksessa kversetiini oli valikoitunut nanopartikkelissa käytettäväksi flavonoidiksi, sillä sen ei ole todettu aiheuttavan immunologista vastetta elimistössä ja sillä on lukuisia vaikutusmekanismeja. Kversetiinin monet eri vaikutusmekanismit bakteereihin tekevätkin siitä todennäköisesti lupaavimman flavonoidiyhdisteen lääketieteellisuuden kehitystyössä. Sen lisäksi, että kversetiini toimii yksistään bakteereja vastaan, se oli myös tehokas antibioottiresistenttejä bakteereja vastaan yhdessä antibioottien kanssa. Antibioottiresistenssin yleistyessä kversetiinin ja muiden flavonoidien hyödyntäminen tulee ajankohtaiseksi.

Plaper ym. (2003) tuovat merkittävän ja tarpeellisen näkökulman flavonoidien käyttöön ja kehitykseen antimikrobiaalisina aineina. He tuovat esiin mahdolliset riskit, joita flavonoidien käyttö voisi aiheuttaa. Flavonoidit voivat aiheuttaa ihmisen elimistössä entuudestaan tuntemattomia sivuvaikutuksia ja tarvitaankin paljon tutkimusta ennen kuin flavonoideja voidaan käyttää laajamittaisesti eri infektioiden hoidossa. Tutkimusaiheina voi olla esimerkiksi se, miten flavonoidit vaikuttavat ihmisen luontaisiin bakteereihin esimerkiksi suolistossa tai

mitä eri vaikutuksia flavonoideilla on eri solutyyppeihin ja aiheuttaako flavonoidit soluissa myrkytysreaktioita.

9. Lähdeluettelo

Austin, M. B., & Noel, J. P. (2002). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 20(1), 79–110. <https://doi.org/10.1039/b100917f>

Berube, B., & Wardenburg, J. (2013). *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins*, 5(6), 1140–1166. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>

Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, 146, 104720.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104720>

Durão, P., Balbontín, R., & Gordo, I. (2018). Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, 26(8), 677–691.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005>

Eumkeb, G., Sakdarat, S., & Siritwong, S. (2010). Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine*, 18(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.09.003>

Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2018). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 241–272.

<https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>

Ismail, H., Dragišić Maksimovic, J., Maksimovic, V., Shabala, L., Živanovic, B. D., Tian, Y., Jacobsen, S.-E., & Shabala, S. (2016). Rutin, a flavonoid with antioxidant activity, improves plant salinity tolerance by regulating K^+ retention and Na^+ exclusion from leaf mesophyll in quinoa and broad beans. *Functional Plant Biology*, 43(1), 75. <https://doi.org/10.1071/fp15312>

Iwashina, T. (2000). The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287–299. <https://doi.org/10.1007/pl00013940>

- Jaakola, L., Määttä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218(5), 721–728. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1161-x>
- Jiménez-González, L., Álvarez-Corral, M., Muñoz-Dorado, M., & Rodríguez-García, I. (2007). Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 125–154. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9059-z>
- Koskimäki, J. J., Hokkanen, J., Jaakola, L., Suorsa, M., Tolonen, A., Mattila, S., Pirttilä, A. M., & Hohtola, A. (2009). Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4), 629–640. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9511-6>
- Li, Y., Kim, J. I., Pysh, L., & Chapple, C. (2015). Four isoforms of Arabidopsis thaliana 4-coumarate: CoA ligase (4CL) have overlapping yet distinct roles in phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiology*, 169(4), pp.00838.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00838>
- Li, Y.-D., Guan, J.-P., Tang, R.-C., & Qiao, Y.-F. (2019). Application of Natural Flavonoids to Impart Antioxidant and Antibacterial Activities to Polyamide Fiber for Health Care Applications. *Antioxidants*, 8(8), 301. <https://doi.org/10.3390/antiox8080301>
- Mun, S.-H., Joung, D.-K., Kim, Y.-S., Kang, O.-H., Kim, S.-B., Seo, Y.-S., Kim, Y.-C., Lee, D.-S., Shin, D.-W., Kweon, K.-T., & Kwon, D.-Y. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 20(8-9), 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.006>
- Naik, J., Misra, P., Trivedi, P. K., & Pandey, A. (2022). Molecular components associated with the regulation of flavonoid biosynthesis. *Plant Science*, 317, 111196. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111196>
- Owens, D. K., Alerding, A. B., Crosby, K. C., Bandara, A. B., Westwood, J. H., & Winkel, B. S. J. (2008). Functional Analysis of a Predicted Flavonol Synthase Gene Family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147(3), 1046–1061. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117457>
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(2), 530–536. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01006-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01006-4)

- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., & Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 21–34.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., & Jabbar, A. (2010). Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.*, 27(2), 238–254. <https://doi.org/10.1039/b916096e>
- Sasaki, Y., & Nagano, Y. (2004). Plant Acetyl-CoA Carboxylase: Structure, Biosynthesis, Regulation, and Gene Manipulation for Plant Breeding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(6), 1175–1184. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1175>
- Schmitz-Hoerner, R., & Weissenböck, G. (2003). Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry*, 64(1), 243–255. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00203-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00203-6)
- Shah, A., & Smith, D. L. (2020). Flavonoids in Agriculture: Chemistry and Roles in, Biotic and Abiotic Stress Responses, and Microbial Associations. *Agronomy*, 10(8), 1209.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10081209>
- Shah, S., Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2007). The polyphenol (–)-epicatechin gallate disrupts the secretion of virulence-related proteins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 181–185. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02296.x>
- Singh, B., Kumar, A., & Malik, A. K. (2017). Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 38(6), 820–832.
<https://doi.org/10.1002/elps.201600334>
- Stapleton, P. D., Shah, S., Anderson, J. C., Hara, Y., Hamilton-Miller, J. M. T., & Taylor, P. W. (2004). Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23(5), 462–467.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.09.027>
- Sun, D., Li, N., Zhang, W., Yang, E., Mou, Z., Zhao, Z., Liu, H., & Wang, W. (2015). Quercetin-loaded PLGA nanoparticles: a highly effective antibacterial agent *in vitro* and anti-infection

application *in vivo*. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3310-0>

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development*. Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Treutter, D. (2005). Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581–591. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873009>

Wu, S.-C., Yang, Z.-Q., Liu, F., Peng, W.-J., Qu, S.-Q., Li, Q., Song, X.-B., Zhu, K., & Shen, J.-Z. (2019). Antibacterial Effect and Mode of Action of Flavonoids From Licorice Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02489>

Zhang, L., Kong, Y., Wu, D., Zhang, H., Wu, J., Chen, J., Ding, J., Hu, L., Jiang, H., & Shen, X. (2008). Three flavonoids targeting the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. *Protein Science*, 17(11), 1971–1978. <https://doi.org/10.1110/ps.036186.108>