

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE



JANA NAMNIECE

LUNASĪNA IZPLATĪBA GRAUDAUGU ŠĶIRNĒS UN
LĪNIJĀS UN FARMAKOLOĢISKAIS
RAKSTUROJUMS

Promocijas darbs

Doktora grāda iegūšanai Farmācijas nozarē

Apakšnozare: Farmakognozija

Rīga, 2017

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē laika posmā no **2012.**
līdz 2016. gadam.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē».

Darba zinātniskā vadītāja: **Dr.habil.biol., prof.Ruta Muceniece**

Darba recenzenti:

- 1) **Nikolajs Sjakste**, *Dr.habil.biol., prof.*, LU Medicīnas fakultātē
- 2) **Inga Urtāne**, *Dr. farm., docente*, RSU
- 3) **Vitalis Briedis**, *Dr.med., prof.*, Lietuvas Veselības zinātņu Universitātē

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2017. gada 7.aprīlī, plkst. 14:00, Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā, Jelgavas ielā 1, 223.auditorijā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulv. 19.

LU medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs _____ / *Valdis Pīrāgs* /

promocijas padomes sekretāre _____ / *Kristīne Saleniece* /

ANOTĀCIJA

Lunasīns ir 43 aminoskābju ķēdes garš peptīds, kuru vispirms atklāja sojas pupās, bet vēlāk atrada arī dažādos graudaugos un citos augos. Ar lunasīnu bagātināts sojas produkts nesēn ir reģistrēts ASV kā uztura bagātinātājs holesterīna līmeņa samazināšanai, un to sāk izplatīt Eiropā. Nākotnē lunasīns varētu kļūt par zālēm, ja izdosies izstrādāt lētu un piemērotu tā ieguves metodi (sintēzes vai rekombinētās biotehnoloģijas veids) un tiks veikti papildu pētījumi lunasīna farmakoloģisko un klīnisko efektu noskaidrošanai. Līdz šim visvairāk pētīti no sojas izolētā lunasīna vai ar lunasīnu bagātinātu augu produktu pretvēža efekti, bet mazāk — tā pretiekaisuma un antioksidatīvās īpašības. Joprojām maz ir zināms par lunasīna lomu un daudzumu augos un faktoriem, kas ietekmē lunasīna producēšanos augu sēklās. Latvijā un arī citur Eiropā soja nav tik populārs pārtikas augs kā graudaugi un kartupeļi. Tāpēc aktuāli ir pētījumi par bioaktīvajām vielām, tajā skaitā lunasīnu, arī citos augos.

Promocijas darba mērķis bija eksperimentāli noskaidrot lunasīna izplatību graudaugu un kartupeļu šķirnēs un līnijās un raksturot tā producēšanās saistību ar šķirni un selekcijas līniju un lauksaimniecības sistēmu (bioloģiskā un konvencionālā), kā arī pētīt lunasīna farmakoloģisko darbību. Lai sasniegtu mērķi, vispirms optimizējām šķidrums hromatogrāfijas maspektrometrijas tandēma metodi lunasīna koncentrācijas mērīšanai, ieviešot būtiskus uzlabojumus lunasīna kvalitatīvai un kvantitatīvai analīzei. Izmantojot šo metodi, atklājām lunasīnu auzās un tritikālē. Divu gadu ražās monitorējām lunasīna saturu miežos, auzās, ziemas rudzos un kviešos, bet tritikālē — trīs gadu ražās. Novērojām, ka lunasīna saturs augu sēklās ir mainīgs un atšķiras atkarībā no šķirnes vai līnijas, bet nekonstatējām lunasīna satura korelāciju ar proteīnu daudzumu graudos vai β glikāna saturu auzās. Audzējot 22 miežu šķirnes un līnijas paralēli bioloģiskajā un konvencionālajā lauksaimniecības sistēmā, novērtējām agronomijas tipa ietekmi uz lunasīna saturu un atklājām, ka šķirnei vai līnijai ir lielāka ietekme nekā audzēšanas veidam. Meteoroloģisko apstākļu ziņā pētījuma gadi (2010. un 2011. gads) bija līdzīgi. Daudz neatšķīrās vidējā temperatūra un nokrišņu daudzums, tāpēc klimata ietekmi neizdevās noskaidrot. Pirmo reizi parādījām, ka lunasīns atrodams arī laboratorijas dzīvnieku pārtikas granulās, kas pieļauj bioloģiski aktīva lunasīna nonākšanu laboratorijas dzīvnieku orgānos. Neskatoties uz to, ka lunasīns ir atrasts arī nakteņu dzimtas augos, mēs neatradām

lunasīnu ne kartupeļu bumbuļos, ne sēklās. Zinātniskajā literatūrā ir publicēts, ka no sojas, miežiem un kviešiem izolētais lunasīns saglabā bioloģiski aktīva peptīda īpašības. Mēs parādījām, ka arī no auzām izolētais lunasīns ir bioloģiski aktīvs un uzrāda sintezētajam lunasīnam līdzīgu antioksidatīvo aktivitāti *in vitro* testos.

Pēc darbā iegūtajiem datiem var secināt, ka lunasīna producēšanās graudaugos ir saistīta aršķirni vai līniju, bet mazāk — ar audzēšanas veidu. Mēs atklājām bioloģiskai audzēšanai piemērotas graudaugu šķirnes un līnijas, kas producē vairāk lunasīna un ko varētu audzēt funkcionālās pārtikas iegūšanai, jo no graudaugiem izolētais lunasīns, salīdzinot ar sintētisko peptīdu, ir tikpat bioloģiski aktīvs. Sintētiskais lunasīns tika izmantots kā kontrole lunasīna satura analīzei augos un farmakoloģisko efektu pārbaudei *in vitro*. Lunasīns ir identificēta jauna molekula dažādu signālceļu farmakoloģiskai regulācijai, un mūsu pētījumi ir būtiski papildinājuši zināšanas par šo dabas vielu.

Atslēgvārdi: lunasīns, bioloģiskais un konvencionālais audzēšanas veids, graudaugi, ŠH/MS/MS, antioksidatīvie efekti, šūnu proliferācija.

ANNOTATION

Lunasin is 43 amino acid residues long peptide originally found in soybeans and later found in various cereals and other plant species. Recently, lunasin-enriched soy product recommended for the lowering of cholesterol level has been registered as a food supplement in USA and there are attempts to distribute it in the Europe. In the future, lunasin could become a drug if we succeed in developing of a cheap its acquisition method (synthesis or recombinant biotechnology), as well as there is a necessity to continue pharmacological and clinical studies. Until now, the anti-cancer effects of lunasin isolated from soy or lunasin-enriched plant products are widely studied, but its anti-inflammatory and antioxidative properties are less investigated. Very little is known about the role of lunasin in plants and factors that determine lunasins' production in seeds. In Latvia and Europe soy is not so popular as cereals and potato. Therefore we focused our studies on lunasin in these plants.

The aim of the thesis was to find out presence of the lunasin in cereal and potato varieties and selection lines, to clarify whether growing manner and environment influence the levels of lunasin, as well as to select appropriate varieties for organic farming and to study lunasin's pharmacological effects. Firstly, we have developed and optimized liquid chromatography mass spectrometry tandem method for measuring the concentration of lunasin in seed extracts by introducing substantial improvements for qualitative and quantitative analysis. Using this method, we have discovered the presence of lunasin in triticale and oats. We monitored content of the lunasin in barley, oats, winter rye and wheat during two harvests, but in triticale during three years' harvests. We observed that level of lunasin in grains is variety or line-dependently variable, but did not find correlation between the contents of the lunasin and protein in the grains and with level of β -glucan in oats. By growing 22 barley varieties and lines alongside in organic and conventional farming systems, we have evaluated influence of the agronomic farming type on the levels of lunasin and have shown that variety has a greater impact on that than the growing manner. Meteorologically the both study years were almost similar as the average temperature and raining were alike. Therefore we could not draw conclusion about influence of climate on the lunasin's content. For the first time, we demonstrated that lunasin is also found in laboratory animal food pellets, which allows us to speculate that the biologically active lunasin may accumulate into the laboratory animal organs. Despite the fact that others have found lunasin in *Solanaceae* plants, we did not find lunasin neither in potato tubers nor in potato seeds. We have shown that lunasin isolated from oats is biologically active and displays *in vitro* tests the similar antioxidant activity to that of synthetic lunasin and similarly affect cell

proliferation. Obtained study results confirmed that levels of lunasin produced by cereals are variety-dependent and less dependent on the type of farming. We have selected appropriate varieties and lines with the highest lunasin content for the organic growing. Lunasin isolated from plants is similarly to the synthetic peptide biologically active therefore lunasin-containing plants are suggested for consumption as a functional food. In many studies lunasin has been identified as a new signaling molecule involved in the regulation of different pharmacological pathways and we have added essentially new data about this natural compound.

Keywords: lunasin, biological and conventional cultivation, cereals, LC/MS/MS, antioxidative effects, cell proliferation.

SATURS

ANOTĀCIJA	3
ANNOTATION.....	5
SATURS	7
SAĪSINĀJUMU SKAIDROJUMS.....	9
IEVADS	11
Darba mērķis	15
Darba uzdevumi	15
Darba hipotēze	15
Darba zinātniskā novitāte	16
Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes	17
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	18
1.1. Funkcionālā pārtika	18
1.2. Graudaugu vieta funkcionālās pārtikas klāstā	20
1.3. Lunasīna atklāšana un izplatība augos	22
1.4. Lunasīna molekulas uzbūve	26
1.5. Lunasīna bioloģiskā aktivitāte.....	30
1.5.1. Lunasīna pretvēža efekti.....	30
1.5.2. Pretiekaisuma un imunomodulējošā darbība.....	34
1.5.3. Holesterīna līmeni samazinošā darbība	35
1.6. Lunasīna biopieejamība.....	37
1.7. Lunasīna ietekme uz peļu uzvedību un smadzeņu dopamīnerģisko sistēmu	38
1.8. Lunasīna mijiedarbība ar zāļu vielām	38
2. MATERIĀLI UN METODES.....	39
2.1. Reaģenti.....	39
2.2. Materiāli	40
2.3. Aparatūra.....	40
2.4. Lunasīna ekstrahēšana no graudiem, sēklām un kartupeļiem	41
2.5. Cietās fāzes ekstrakcija	42
2.6. Standartšķīduma pagatavošana	43
2.7. Lunasīna noteikšanas šķidrums hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode.....	43
2.8. Lunasīna koncentrācijas aprēķini	45
2.9. Proteīnu daudzuma noteikšana.....	46
2.10. Antioksidantu aktivitātes noteikšana.....	46
2.10.1. Brīvā 2,2-difenil-1-pikrillhidrazilradikāļa (DPPH) koncentrācijas samazināšanas metode...47	

2.10.2. Glutationa peroksidāzes aktivitātes mērīšana.....	47
2.11. Šūnu kultivēšana	48
2.12. Šūnu proliferācijas pārbaude.....	48
3. REZULTĀTI.....	50
3.1. Lunasīna identitātes un kvantitatīvās noteikšanas metodes optimizācija un validācija	50
3.2. Miltu iesvara daudzuma izvērtēšana	59
3.3. Lunasīna atklāšana tritikālē.....	61
3.4. Lunasīna saturs rudzos	66
3.5. Lunasīna saturs kviešos.....	68
3.6. Lunasīna izplatība auzu šķirnēs un līnijās.....	69
3.7. Audzēšanas veida ietekme uz lunasīna daudzumu miežos	72
3.8. Lunasīna satura salīdzinājums graudaugos	77
3.9. Pētījumi par lunasīna producēšanos kartupeļos.....	78
3.10. Lunasīna koncentrācija dzīvnieku barības granulās.....	80
3.11. No auzām ekstrahētā un sintētiskā lunasīna antioksidanta aktivitāte.....	81
3.12. Lunasīna efekts uz šūnu proliferāciju.....	82
3.13. Lunasīna efekts uz glutationperoksidāzes aktivitāti.....	83
4. DISKUSIJA.....	84
4.1. Lunasīna kvantitatīvās noteikšanas metožu attīstība.....	84
4.2. Lunasīna līmeņa svārstības augos	88
4.3. Lauksaimniecības sistēmas ietekme uz lunasīna saturu miežos.....	92
4.4. No auzām izolētā lunasīna bioloģiskā aktivitāte	95
4.5. Lunasīna molekulas potenciāls jaunu zāļu dizainā.....	96
5. SECINĀJUMI.....	100
6. Pētījumu rezultātu publikācijas un ziņojumi	101
7. PATEICĪBAS.....	103
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	104

SAĪSINĀJUMU SKAIDROJUMS

- AEŠH** augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija
- AKT** serīna-treonīna kināzes signāltransdukcijas ceļš
- ANOVA** (*analysis of variance*) dispersijas analīze
- apgr./min.** apgriezieni/ minūtē
- BBI** Bovmana- Bērka proteāžu inhibitors
- BSA** liellopu seruma albumīns
- Caco-2** cilvēka epiteliālās kolorektālās adenokarcinomas šūnu līnija
- CBP** CREBBP gēnu kodējošais proteīns; kodola proteīns
- CFE** cietās fāzes ekstrakcija
- c-jun** proto-onkogēns, kas kodē Jun proteīnu
- CNS**- centrālā nervu sistēma
- COX-2**- ciklooksigenāze
- DMEM** Dulbecco modificētā Eagle barotne
- DMSO** dimetilsulfoksīds
- DPPH** 2,2-difenil-1-pikrillhidrazilradikālis
- D1** dopamīna receptora pirmais subtips
- D2** dopamīna receptora otrais subtips
- ECM** ekstracelulārās matricas
- EDTA** etilenediamīnetetraetiķskābe
(*IUPAC 2-({2[Bis(karboksilmetil)amino]etil}(karboksimetil)amino)etiķskābe*)
- ELISA** enzīmatkarīga imūnsorbcijas metode
- ESI (Electrospray Ionization)** elektroizsmidzināšana
- E1A** onkoproteīns; adenovirālais onkogēns
- E2** prostaglandīns
- FDA** pārtikas un zāļu pārvalde (ASV)
- GCN5** histonu acetiltransferāze
- Gm2S1** gēns
- GPx** glutaciona peroksidāzes aktivitāte
- G2/M fāze** šūnu cikla fāze
- HATs** histonu acetiltransferāzes
- HEK 293** cilvēka embrionālo nieru šūnu līnija
- HepG2** cilvēka aknu karcinomas šūnu līnija

HMG-CoA 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzīma-A reduktāze
H3 histons
IC₅₀ (*half maximal inhibitory concentration*) koncentrācija 50% (1/2) inhibīcijai
IL6 interleikīns
IL-1 β interleikīns
iNOS inducējamā slāpekļa oksīda sintāze
Ki inhibīcijas konstante
LES liellopu embrija serums
Leu – leicīns
LPS lipopolisaharīdi
LSE ar lunasīnu bagātināts sojas ekstrakts
Lys - lizīns
Met metionīns
MTT 3-(4,5-di,metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds;
MS/MS tandēmmasspektrometrija
NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)- nukleārais faktors-
kappa B
PBS fosfātu, nātrija hlorīda buferis
PCAF histonu acetiltransferāze (arī: P300/CBP-asociētais faktors)
pp32 tumorsupresējošais proteīns
p52 transkripcijas faktors
p65 un p50 heterodimēri (NF- κ B signālceļa proteīni)
p300 kodola proteīns
RAW 264.7 peļu monocītu makrofāgu šūnu līnija
Rb retinoblastomas proteīna gēns
RT-PCR reālā laika polikēdes reakcijas metode
SD standartnovirze
SIR (*Single Ion Recording*) viena jona pierakstīšana
SP1 transkripcijas faktors
SREBP (*sterol regulatory element binding*) -sterolu regulatorā elementa saistīšanas proteīns
THP-1 cilvēku makrofāgu šūnu līnija
 α V β 3 integrīns
WST-8- 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazols)
ZBL zema blīvuma lipoproteīns

IEVADS

Augi ir nodrošinājuši visas cilvēku vajadzības un devuši pajumti, apģērbu, pārtiku, garšvielas, smaržas un zāles. Tie ir sarežģītu tradicionālās medicīnas sistēmu ārstēšanas metožu pamatā, kuru vidū ir Ajurvēdas, Unani un Ķīnas medicīnas sistēmas. Arī Āfrikas, Austrālijas, Centrālās un Dienvidamerikas etnobotānikas un etnofarmakognozijas atklājumi ir devuši savu artavu jaunu zāļu molekulu atrašanā (Gurib-Fakim, 2006). Pat šodien dabas vielas farmācijā ieņem tikpat svarīgu vietu kā sintētiski atrastas molekulas. Aprēķināts, ka apmēram 50% zāļu vai aktīvo vielu ir dabas vielu analogi (Koehn and Carter, 2005; Verpoorte, 2000), un jaunu zāļu meklējumos, lai uzlabotu to atrašanas iespējas un noskaidrotu lietošanas drošību, tiek izmantotas sen zināmas farmakognozijas metodes (Chin *et al.*, 2006; Mishra and Tiwari, 2011; Dhimi, 2013). Tomēr pašreizējie augu pētījumi notiek ar daudzpusīgu pieeju, apvienojot botānikas, fitoķīmiskās, bioloģiskās un molekulārās metodes. Multidisciplinārā pieeja ir radījusi jaunas apakšnozares, piemēram, klīnisko farmakognozi, analītisko farmakognozi, industriālo farmakognozi, un iezīmējas pilnīgi jauni virzieni, tādi kā molekulārā farmakognozija, genoma un metaboloma farmakognozija (Dhimi, 2013; Yuliana *et al.*, 2011). Mūsdienās ārstniecības līdzekļu meklēšanas avots ir ne tikai augi: par izpētes mērķiem cerībā atrast jaunas un efektīvas zāles kalpo arī dzīvnieki, baktērijas, sēnes, jūras organismi un minerāli. Turklāt ne tikai ārstniecības augi, bet arī ēdamie augi turpina būt ieguves vai informācijas avots jauniem potenciāliem zāļu līdzekļiem pret vēzi, HIV/AIDS, Alzheimeras slimību, malāriju un sāpēm (Balunas and Kingborn, 2005; Petrovska, 2012). Tomēr bioloģiski aktīvās vielas augos parasti ir niecīgos daudzumos, kas reizēm ir nepietiekami pat izpētei, tāpēc vajadzīgas sintēzes iespējas vai ģenētiski modificētu augu radīšana farmakoloģiski aktīvas vielas pavairošanai augā. Bez ģenētiskās modifikācijas bioaktīvo vielu saturu augos varētu palielināt, arī izmantojot piemērotu agronomijas sistēmu un, piemēram, audzējot augus bioloģiskajā sistēmā, ja tā nodrošinātu lielāku aktīvo vielu saturu.

Mūsdienās daudzi medikamenti tiek sintezēti, un mēs aizmirstam, ka attiecīgie savienojumi vai tā analogi kādreiz bijuši dabas produkti. Piemēram, jau vairāk nekā pirms 2500 gadiem cilvēki izmantoja baltā vītola mizu, nezinādami, ka tā satur salicilskābi, ko vēlāk sintezēja un radīja aspirīnu jeb acetilsalicilskābi. Šodien zinātnieki joprojām pēta, kādi ir aspirīna darbības mehānismi, atklājot arvien jaunus darbības veidus. Bet neatkarīgi no zinātnieku atklājumiem, mūsdienu cilvēks aspirīnu lieto tāpat kā mūsu senči to darīja pirms tūkstošiem gadu, tikai vītola mizas ekstrakta veidā. Daudzas dabas vielas, kas vēsturiski uzskatītas par zālēm, mūsdienās lieto kā pārtikas produktus; piemēri ir kafija, tēja, cukurs,

citrons, šokolāde, pipari, ķiploki u.c. (Riddle, 2002). Tomēr lielākā daļa medicīnā lietoto dabas vielu ir izolētas no neēdamiem augiem. Īpaši tas attiecināms uz pretvēža vielām: 65% jeb skaitā 11 no augu izcelsmes pretvēža zālēm ir izolētas no neēdamiem augiem, bet 35% jeb 6 — no ēdamiem augiem (Ji *et al.*, 2014). Bioloģiski aktīvas vielas augos var būt ļoti mazos daudzumos, kas variē atkarībā no augsnes un klimata, tāpēc augu pētījumi bieži vainagojas ar aktīvās vielas formulas izzināšanu, un pēc tam šo vielu sintezē vai iegūst pussintētiskā ceļā.

Daudzi no ēdamajiem augiem izolētie savienojumi tiek izmantoti kā uztura bagātinātāji un kā funkcionāla pārtika, nesasniedzot zālēm izvirzītos kritērijus efektivitātes un dozēšanas ziņā. Par funkcionālu pārtiku sauc pārtikas produktus, kas sniedz labumu veselībai, ja tos patērē kā sabalansēta uztura sastāvdaļu. Tomēr to loma veselības uzlabošanā ir zinātniski jāpierāda, līdzīgi kā pierāda zāļu efektivitāti. Tas nozīmē, ka jāveic atkārtoti, randomizēti, ar placebo kontrolēti, intervences pētījumi ar cilvēkiem. Šodien ne visi pārtikas produkti tirgū, kurus uzskata par funkcionālo pārtiku, tādi ir, jo nav pietiekami uzticamu klīnisko datu (Ozen *et al.*, 2012). Līdz šim funkcionālās pārtikas produkti lielākoties ir ar norādēm par sirds slimību risku mazināšanu un galvenokārt koncentrējas uz galvenajiem riska faktoriem, proti, holesterīna līmeņa samazināšanu, cukura diabēta un hipertensijas risku samazināšanu. Pēdējā laikā sabiedrībā pieaug interese par organiskās jeb bioloģiskās saimniekošanas ceļā iegūtiem pārtikas produktiem, un reizē sabiedrība gaida no zinātniekiem atbildes uz jautājumiem, vai šādi augi satur vairāk ārstniecisku vielu un vai visus ārstniecības augus vajadzētu audzēt bioloģiskā veidā.

Līdz šim ir ļoti maz pētījumu, kuros salīdzināts ārstniecisko vielu daudzums bioloģiski un konvencionāli audzētos pārtikas augos. Esošajos pētījumos nav atrasti ļoti ticami pierādījumi, ka bioloģiski audzēti pārtikas produkti būtu ar citām īpašībām kā konvencionāli audzēti (Huber *et al.*, 2011). Tomēr organiskā jeb bioloģiskā pieeja nozīmē audzēt pārtikas augus ar ierobežotu pesticīdu, augšanas stimulatoru, antibiotiku, ģenētiski modificētu organismu u.c. izmantošanu, bet konvencionālā jeb klasiskā pieeja veicina intensīvu industriālu saimniekošanu ar mērķi iegūt pēc iespējas lielāku ražu.

Sojas proteīni var kalpot par avotu bioaktīviem peptīdiem ar unikālām īpašībām veselības uzlabošanas ziņā — ar profilaktiskām īpašībām un spēju ārstēt hroniskas saslimšanas, piemēram, sirds slimības, aptaukošanos, samazināt imūnās sistēmas traucējumus un vēža progresiju. Salīdzinājumā ar mazmolekulārām zāļu vielām peptīdiem piemīt augsta afinitāte, mērķu selektivitāte, zema toksicitāte un augstas audu cauriešanas īpašības (Bhutia and Maiti,

2008). Pēdējo gadu laikā sojas proteīni un peptīdi (tajā skaitā arī lektīni un lunasīns) tiek uzskatīti par potenciāliem zāļu vielu kandidātiem, jo salīdzinājumā ar alternatīvajām ķīmijterapijas molekulām tiem ir vairākas priekšrocības. Pētījumos ar dzīvniekiem sojas proteīns uzrāda labus rezultātus kancerogēnu ķīmisku vielu inducētos audzējos (Koski, 2006). No sojas izolētie lektīni ir specifiska bioloģiski aktīvu glikoproteīnu grupa, kas uzrāda pretvēža iedarbību visu stadiju pētījumos, arī klīniskajos (de Mejia *et al.*, 2003). Lektīnu aktivitātes darbības mehānismi vērsti uz vēža šūnu membrānām, šūnu proliferācijas samazināšanu, apoptozes indukciju un makrofāgu audzējspecifisko citotoksicitāti. Domā, ka lektīniem varētu būt spēcīgs efekts uz imūnsistēmas regulāciju un ka tie iesaistās dažādu interleikīnu producēšanā (de Mejia and Prisecaru, 2005). Tomēr ir nepieciešams veikt vēl daudz pētījumu, lai noskaidrotu sojas lektīnu ietekmi uz vēža rašanās risku, lai arī tos jau lieto vēža ārstēšanā, jo pētījumos tie ir uzrādījuši augstu zāļu potenciālu.

Bowmana-Bērka proteāžu inhibitors (BBI) ir polipeptīds ar 71 aminoskābju ķēdes garu struktūru. Tā pretvēža aktivitāte noteikta gan *in vivo*, gan *in vitro* testos (Losso, 2008). Šo pētījumu rezultātā ASV Pārtikas un Zāļu departaments (FDA) 1992. gadā BBI piešķīra jaunas zāļu vielas statusu. Klīniskajos pētījumos noteica BBIC (Bowmana-Bērka proteāžu inhibitora koncentrāts) pretvēža darbību (Armstrong *et al.*, 2000, 2003; Meyskens, 2001). Rezultātā secināja, ka BBIC ir pacientiem labi panesams un norāda uz daudzsoļiem rezultātiem prostatas un mutes vēžu gadījumos. BBIC ir efektīvs arī prostatas hiperplāzijas un čūlainā kolīta sākumstadijās. Kunitztipa tripsīna inhibitors (KTI) ir vēl viens proteāžu inhibitors, kas sākotnēji tika izolēts no sojas. KTI efektu atšķirība no BBIC ir saistāma ar tā spēju supresēt vēža šūnu invāziju un metastāzes (de Mejia and Dia, 2010).

Lunasīns ir sojā un vēlāk citos augos atklāts 43 aminoskābju ķēdes garš peptīds, kas nesen ASV ir reģistrēts kā uztura bagātinātājs un ko sāk izplatīt Eiropā. Iespējams, ka nākotnē lunasīns varētu kļūt par zālēm, bet nepieciešami klīniskie pētījumi un jāturpina farmakoloģiskie pētījumi. Strauji pieaugot interesei par lunasīnu, ir izstrādāta rekombinētā lunasīna ieguves metode, jo augos lunasīna daudzums nav tik liels, lai augu ekstraktam varētu novērot farmakoloģiskus efektus. Tomēr rekombinētais lunasīns vēl nav komerciāli pieejams, un līdz šim eksperimentos izmanto no augiem izolētu peptīdu vai ar to bagātinātu frakciju, vai arī sintezēto lunasīnu. Eksperimentos *in vitro* šūnu līnijās un *in vivo* laboratorijas dzīvniekiem ir atklāta lunasīna pretvēža, pretiekaisuma un antioksidanta darbība, kā arī spēja pazemināt holesterīna līmeni. Tomēr vēl trūkst klīnisko pierādījumu, un ļoti neliels ir arī lunasīna biopieejamības pētījumu skaits, turklāt biopieejamības noskaidrošanas eksperimentos ir

pedalījies mazs cilvēku skaits. Pretvēža vielas augos nav retums, bet lunasīns ir īpašs, jo tam ir specifisks darbības mehānisms. Šis peptīds ātri internalizējas šūnās, šūnas kodolā inhibē histonu acetilēšanu un, sabojājot histonu acetilēšanās/deacetilēšanās dinamiku, izraisa šūnu apoptozi. Uz šo defektu vispirms reaģē ātri augošas šūnas, kādas ir vēža šūnas. Lunasīnam piemīt plaša spektra pretiekaisuma darbība. Zināms, ka oksidatīvais stress un iekaisums ir viskritiskākie riska faktori deģeneratīvo un ar kancerogēni saistīto slimību attīstībā. Sojas produkti jau kopš seniem laikiem ieteikti kā funkcionālais uzturs kardiovaskulāro saslimšanu risku novēršanai un iespējams, ka šo sojas efektu nodrošina tieši lunasīns. Lunasīns samazina holesterīna saturu, jo inhibē 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzīma-A (HMG-CoA) reduktāzes gēna ekspresiju un līdz ar to pazemina HMG-CoA reduktāzes līmeni, tā samazinot aknu spēju sintezēt holesterīnu.

Latvijā sojas produkti nav tik populāri kā graudaugi, tāpēc aktuāli ir pētījumi par lunasīna izplatību citos augos, arī mūsu klimatā audzētos graudaugu un kartupeļu šķirnēs un selekcijas līnijās. Mūsdienās ir ļoti maz pētījumu par bioloģiski aktīvo vielu saturu augos atkarībā no audzēšanas apstākļiem. Lai atrastu pierādījumus graudu bioloģiski aktīvo vielu farmakoloģiskajiem efektiem, notiek graudu sastāva, kā arī audzēšanas veida (bioloģiskā jeb organiskā lauksaimniecība, konvencionālā jeb industriālā lauksaimniecība, integrētā lauksaimniecība) ietekmes izvērtēšana. Pārtikas graudus audzē gan bioloģiskajos, gan konvencionālajos laukos, bet maz ir tādu pētījumu, kuros vienas un tās pašas šķirnes būtu audzētas paralēli abos veidos un salīdzināti bioloģiski aktīvo vielu līmeņi.

Šis pētījums ir veltīts galvenokārt lunasīna izplatības graudaugos un ar lunasīnu bagātāko šķirņu un līniju noskaidrošanai, kā arī bioloģiskā un konvencionālā lauksaimniecības veida ietekmes uz lunasīna saturu izvērtēšanai. Pētījumi tika veikti divu un trīs gadu laikā, kuros nenovērojām dažādus klimatiskos apstākļus. Sintētiskā lunasīna efektu pētījumi *in vitro* palīdzēja uzlabot lunasīna identificēšanas metodi un pierādīt no auzām izolētā lunasīna 43 aminoskābju struktūru. Lunasīns ir identificēta jauna molekula dažādu signālcēļu farmakoloģiskai regulācijai. Tomēr farmakoloģisko efektu pētījumi ir tikai sākuma stadijā. Joprojām aktuāla ir sintētiskā lunasīna biopiejamības un metabolisma noskaidrošana un tā šķelšanas rezultātā radušos fragmentu biopiejamības un bioloģisko efektu pētīšana.

Promocijas darba eksperimentālā daļa izstrādāta Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē. Graudaugu un kartupeļu paraugi analizēti saņemti no Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta un Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūta pētniekiem.

Promocijas darbā iekļauti publicēti un npublicēti dati.

Darba mērķis

Noskaidrot lunasīna izplatību pārtikas augos, raksturot faktorus, kas ietekmē tā daudzumu graudos, un pētīt peptīda farmakoloģisko darbību.

Darba uzdevumi

1. Optimizēt un pilnveidot šķidrums hromatogrāfijas/masspektrometrijas (ŠH-MS/MS) tandēma metodi lunasīna identificēšanai augu ekstraktos un tā daudzuma noteikšanai.
2. Noskaidrot, vai līdz šim nepētītos graudaugos tritikālē un auzās ir atrodams lunasīns. Pētīt un salīdzināt no auzām ekstrahētā peptīda un sintētiskā lunasīna antioksidanto darbību un ietekmi uz šūnu proliferāciju.
3. Pētīt lunasīna līmeņa variācijas Latvijā audzētu graudaugu šķirnēs un līnijās un noskaidrot ar lunasīnu bagātākās šķirnes un līnijas.
4. Salīdzināt lunasīna līmeni 22 dažādās miežu šķirnēs un līnijās, kas audzēti bioloģiskajā un konvencionālajā lauksaimniecības sistēmā, un novērtēt audzēšanas veida ietekmi uz lunasīna producēšanos augos. Noteikt bioloģiskajai lauksaimniecībai piemērotas ar lunasīnu bagātas šķirnes un līnijas.
5. Noskaidrot, vai kartupeļu bumbuļi, sēklas un dzīvnieku pārtikas granulas satur lunasīnu.

Darba hipotēze

Augos bioloģiski aktīva lunasīna producēšanos ietekmē dažādi faktori, piemēram, šķirne un līnija, audzēšanas veids un klimats. Sintētiskajam un no augiem izolētajam lunasīnam ir identiski farmakoloģiskie efekti.

Darba zinātniskā novitāte

Eksperimentālajā darbā pētīta bioloģiski aktīva peptīda lunasīna, kam nākotnē paredz jaunu zāļu potenciālu, izplatība pārtikas augos un novērtēta agronomijas veida ietekme uz lunasīna līmeni graudos, kā arī pierādīta no auzām izdalītā lunasīna bioloģiskā darbība, salīdzinot to ar sintētiskā lunasīna efektiem.

Iegūtie rezultāti sasniegti, būtiski uzlabojot šķidrums hromatogrāfijas masspektrometrijas/masspektrometrijas metodi.

- Aprobēta cietfāzes kolonnu izmantošana lunasīna ekstrahēšanai no miltiem un lunasīna molekulāro jonu masas spektru izmantošana peptīda fragmentu identificēšanai un molmasas aprēķināšanai.
- Pirmo reizi pierādīts, ka lunasīnu producē tritikāles un auzu šķirnes un līnijas un, ka šo peptīdu satur arī ziemas rudzi un kvieši; monitorējot šī peptīda daudzumu ziemas rudzos, kviešos, tritikālē, miežos un auzās 2–3 gadus, ir pierādīts, ka peptīda producēšanās graudaugos ir atšķirīga. Tritikāle ir ar lunasīnu bagātākais graudaugs.
- Pirmo reizi pierādīts, ka atšķirīgās lauksaimnieciskās audzēšanas sistēmās audzētu miežu šķirnēm un līnijām lunasīna producēšanos miežu genotipos ietekmē tieši šķirne vai līnija. Parādīta iespēja atlasīt un selekcionēt bioloģiskai lauksaimniecībai piemērotu miežu šķirnes, kas būtu ieteicamas kā funkcionālā pārtika. Pierādīts, ka šķirne Rubiola, kas ir piemērota organiskai kultivēšanai, ir viena no ar lunasīnu bagātākajām miežu šķirnēm.
- Pirmo reizi pierādīts, ka auzas satur bioloģiski aktīvu lunasīnu ar sintētiskajam lunasīnam līdzīgu antioksidatīvo aktivitāti un ietekmi uz šūnu proliferāciju.
- Pirmo reizi pierādīta lunasīna klātbūtne laboratorijas dzīvnieku pārtikas granulās, kas pieļauj bioloģiski aktīva lunasīna nonākšanu laboratorijas dzīvnieku orgānos.
- Kartupeļi, līdzīgi kā citi nakteņu dzimtas augi, kuru sēklās atrasts lunasīns, varētu producēt lunasīnu. Tomēr lunasīns kartupeļu sēklās un bumbuļos nav atrasts.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Lunasīns producējas graudaugos. Tā producēšanās ir saistīta ar šķirni un līniju, mazāk ar audzēšanas veidu. Bioloģiskajai audzēšanai nepieciešams atlasīt piemērotas šķirnes un līnijas.
2. Lunasīna atklāšana kādā augā nenozīmē to, ka peptīds producējas visos atbilstošās dzimtas augos, tāpēc jāveic pētījumi par lunasīna izplatību katrā konkrētā augā un šķirnē vai līnijā.
3. No augiem izdalītais lunasīns ir bioloģiski aktīvs.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Funkcionālā pārtika

Kad iedzīvotājus lūdz izteikt viedokli par sintezētu ķīmisko vielu un no augiem izolētu vielu izmantošanu medicīnā, sabiedrības viedoklis bieži nosliecas dabas vielu labā. Fitokīmiskās vielas nav organismam nepieciešamās barības vielas, un tās nav vajadzīgas cilvēka ķermeņa dzīvības funkciju uzturēšanai, bet tām ir aizsargājošas vai slimību profilakses īpašības. Augi šīs ķīmiskās vielas ražo, lai aizsargātu sevi vai nodrošinātu signālu pārnesi šūnās, taču pētījumi pierāda, ka tās var arī aizsargāt cilvēkus pret slimībām. Ir vairāki tūkstoši zināmu augu ķīmisko vielu (*phytochemicals*) ar farmakoloģisku darbību (Hasler, 2002). Daži labi zināmi piemēri ir likopēns tomātos, izoflavoni sojā un flavonoīdi augļos. Vislabāk izpētīti ir antioksidanti, kas aizsargā šūnas pret oksidatīviem bojājumiem un samazina risku saslimt ar noteiktiem vēža veidiem. Antioksidanti ir alilgrupas sulfīdi (sīpoli, puravi, ķiploki), karotinoīdi (augļi, burkāni), flavonoīdi (augļi, dārzeņi), polifenoli (tēja, vīnogas) u.c. Cita savienojumu grupa fitoestrogēni atdarina cilvēka hormonu estrogēnu efektus un palīdz mazināt menopauzes simptomus un osteoporozi. Enzīmu aktivitāti stimulē indoli, kas ir atrodami galviņkāpostos. Tie samazina krūts vēža risku, stimulējot enzīmus, kas samazina estrogēnu aktivitāti. Citas vielas — enzīmu blokatori — ir proteāžu inhibitori, un ar tiem bagātas ir soja un pupas, un terpēni (citrusaugļi un ķirši). Saponīni traucē šūnās DNS replikāciju, tādējādi novēršot vēža šūnu vairošanos. Kapsaicīns (pipari) aizsargā DNS no kancerogēniem. Dažas vielas fiziski saistās pie šūnu sienīņām, tādējādi nepieļaujot patogēnu piesaistīšanos šūnai. Ja patogēni nevar piesaistīties, tie neiekļūst cilvēka šūnās. Tā darbojas, piemēram, dzērveņu proantocianidīni, kas samazina urīnceļu infekciju risku un arī uzlabo zobu veselību (Hasler, 2002).

Lielākā daļa pārtikas produktu, izņemot dažus rafinētos pārtikas produktus — cukuru vai alkoholu, satur fitokīmiskas vielas un jau ir daļa no mūsu ikdienas uztura. Jēdziens „funkcionāla pārtika” nav jauns. Jau Hipokrāts mācīja: „Ļauj, lai pārtika ir zāles un zāles ir tavs ēdiens” (Sloan, 2002; Ozen *et al.*, 2012). Tomēr 19. gadsimtā šī filozofija tika ignorēta un priekšplānā izvirzījās mūsdienu medikamentozā terapija. 20. gadsimta pirmajos piecdesmit gados zinātnieku uzmanības centrā bija būtisku pārtikas elementu identifikācija, un it īpaši pētīja vitamīnu lomu dažādu slimību profilaksē. Uzsvars uz barības vielu trūkumu vai nepietiekamību mainījās ar citu filozofiju, kas slimības saistīja ar pārmērībām (*overnutrition*) un norādīja, ka aptaukošanās un liekais svars ir būtiska sabiedrības veselības problēma. Tādējādi sāka mainīties sabiedrības veselības pamatnostādnes. Tagad uzsvars tiek likts uz

sabiedrības veselības politikas un izglītības jomu, norādot, ka svarīga nozīme ir diētai ar zemu piesātināto tauku saturu un jāpaaugstina dārzeņu, augļu, veselu graudu un pākšaugu patēriņš, lai samazinātu hronisku slimību, piemēram, sirds slimību, vēža, osteoporozes, diabēta un insulta risku (Sirtori *et al.*, 2009; Ozen *et al.*, 2012). Zinātnieki pēta fizioloģiski aktīvās sastāvdaļas pārtikā gan no augu, gan no dzīvnieku valsts (pazīstamas attiecīgi kā *phytochemicals* un *zoochemicals*), kas potenciāli varētu samazināt dažādu hronisku slimību risku. Izglītojošie pasākumi apvienojumā ar sabiedrības novecošanos, iedzīvotāju interesi par savas veselības uzlabošanu, izmaiņām pārtikas nozares regulējumā, daudziem tehnoloģiskiem sasniegumiem un veselību veicinošu produktu pieprasījumu tirgū radīja tos produktus, ko mēs tagad pazīstam kā "funkcionālā pārtika" un visbeidzot varēja definēt, ko nākotnē uzskatīt par šo jauno pārtikas produktu kategoriju. Lielākā funkcionālās pārtikas komponentu daļa rodas no augiem, tomēr ir vairāki dzīvnieku vai mikrobu izcelsmes fizioloģiski aktīvo funkcionālās pārtikas sastāvdaļu piemēri (Hasler, 2002). Par funkcionālu pārtiku sauc pārtikas produktus, kas sniedz labumu veselībai, ja tos patērē kā sabalansēta uztura sastāvdaļu. Tomēr to loma veselības uzlabošanā ir zinātniski jāpierāda, un tas būtu jā dara līdzīgi, kā pierāda zāļu efektivitāti. Tas nozīmē, ka jāveic atkārtoti, randomizēti, ar placebo kontrolēti, intervences pētījumi ar cilvēkiem. Šodien ne visi tirgū pieejamie pārtikas produkti, kurus uzskata par funkcionālo pārtiku, tādi patiešām arī ir, jo nav pietiekami daudz uzticamu klīnisko datu. Funkcionālā pārtika ir viens no pārtikas un uztura zinātnes visintensīvāk pētītajiem un plaši reklamētajiem produktiem. Tomēr jāuzsver, ka šie pārtikas produkti un sastāvdaļas nav panaceja pret sliktiem veselības paradumiem. Uzturs ir tikai viens aspekts no visaptverošas pieejas veselīgam dzīvesveidam (Sloan, 2002). Prasības kompleksi aplūkot funkcionālās pārtikas vai pārtikas produktu sastāvdaļu patēriņu kopā ar sabiedrības veselības pētījumu rezultātiem prasa pārdomātus zinātniskus pierādījumus un zinātnieku vienošanos par kritērijiem, par attiecīgo pierādījumu savākšanu labi izstrādātos klīniskos, epidemioloģiskos un laboratorijas pētījumos un neatkarīgu ekspertu atzinumus (Sirtori *et al.*, 2009).

Līdz šim funkcionālās pārtikas produkti lielākoties ir ar norādēm par sirds slimību risku samazināšanu un galvenokārt koncentrējas uz galvenajiem riska faktoriem, proti, holesterīna līmeņa samazināšanu, cukura diabēta un hipertensijas risku samazināšanu. Tādi ir šķiedrvielas, peptīdus, fruktānus, fitosterīnus, omega-3 taukskābes u.c. saturoši produkti. Ir veikti pētījumi par tumšo šokolādi kā dislipidēmijas un hipertensijas profilakses līdzekli, par tējas un kafijas dzeršanas ieguvumiem veselībā, par E vitamīna un ķiploku lomu dislipidēmijas un

aterosklerozes profilaksei, taču tajos iegūtie rezultāti ir pretrunīgi (Sloan, 2002; Ozen *et al.*, 2012; Hasler, 2002; Sirtori *et al.*, 2009).

1.2. Graudaugu vieta funkcionālās pārtikas klāstā

Pilngraudu pārtikas piemēri ir kviešu, rudzu, miežu, griķu, rīsu, kukurūzas un auzu pilngraudu produkti. Termins „pilngraudu” tiek attiecināts arī uz slīpētiem graudiem. Tomēr *Cochrane* datu bāzes apskata rezultāti ir tādi, ka labums veselībai no pilngraudu lietošanas jāinterpretē piesardzīgi, jo konstatēts, ka esošo klīnisko pētījumu dalībnieku skaits nav bijis liels, pētījumi bijuši īslaicīgi un daudzi tikuši komerciāli finansēti. Galvenokārt pētījumi ir bijuši par auzu produktu efektiem koronāro slimību risku novēršanā. Nīderlandē, Kiprā, Spānijā, Zviedrijā un Polijā veiktā pētījumā par brokastu pārslu lietošanas ietekmi uz veselību tika atzīts, ka pārslas varētu samazināt sirds slimību, diabēta un dažu vēža tipu risku (Ozen *et al.*, 2012, Good *et al.*, 2008). Nīderlandē plašā pētījumā atrada, ka pilngraudu lietošana samazina ķermeņa masas indeksu (Van de Vijver *et al.*, 2009), un de Munters ar līdzautoriem (2007) secināja, ka tiek samazināts arī otrā tipa diabēta risks. Lai atrastu pierādījumus graudu bioloģiski aktīvo vielu farmakoloģiskiem efektiem, notiek graudu sastāva pētīšana un apstrādes ietekmes izvērtēšana. No graudiem izolētiem arabinoksilāniem, β glikāniem, alkilresorcinoliem, tokoliem un fitosteroliem pierādīta profilakses loma sirds slimību un diabēta risku mazināšanā (Bartłomiej *et al.*, 2012), bet augos tie nav tik lielos daudzumos, lai šos efektus varētu attiecināt uz pārtikas produktiem. 2012. gada maijā Ņujorkā notika starptautisks ekspertu darba seminārs par auzu pētījumiem, lai apspriestu auzu ietekmi uz cilvēku veselību un šī auga pielietojumu. Šie dažādie eksperti pārstāvēja epidemioloģijas, pārtikas regulējuma, uztura un pārtikas zinātnes, graudu audzēšanas un augu ģenētikas, pārtikas pārstrādes, medicīnas un sabiedrības veselības politikas nozares (Clemens and van Klinken, 2014). Apspriedē pievērsās trim svarīgiem aspektiem: auzu dinamikai, jauniem pētījumiem lauksaimniecībā un veselības zinātnēs un iespējam nākotnes auzu pētījumu pieteikumiem. Auzām ir daudzas unikālas ķīmiskās īpašības, kas varētu dot ieguvumu veselībai, bet auzu audzēšana pasaulē samazinās. Tas notiek, neskatoties uz mūsdienu pētījumu rezultātā radītām sausuma un klimata adaptīvām šķirnēm, kam ir arī lielāka spēja pretoties augu slimībām un kas ir bagātākas ar šķiedrvielām, lipīdiem, β glikāniem un avenantramīdiem.

Daudzos pētījumos noskaidrots, ka visvairāk pētītie graudu komponenti — šķiedrvielas, inulīns, glikāni, rezistentā ciete, karotinoīdi, fenoli, tokotrienoli, tokoferoli un veseli graudi — var būt nozīmīgi slimību profilaksē (sirds un asinsvadu slimības un insults, hipertonijs, metabolais sindroms, 2. tipa cukura diabēts, aptaukošanās, kā arī dažādi vēža veidi). Zināšanas, kas iegūtas par dažādu ķīmisko elementu saturu graudos un pilngraudu funkcionālajām īpašībām, palīdzēs radīt jaunus pārtikas produktus ar veselību uzlabojošām īpašībām (Borneo and Leon, 2012). Summējot trīs prospektīvo kohortu pētījumus, tika ieteikts kartupeļus aizvietot ar pilngraudu produktiem, jo tie bija statistiski ticami samazinājuši 2. tipa diabēta risku (Muraki *et al.*, 2015).

Tritikāle (*x Triticosecale sp. Wittmack ex A. Camus 1927*) ir cilvēku radīts labības augs, kas iegūts, krustojot kviešus ar rudziem (*Triticum spp.* Linnaeus 1753 un *Secale cereale* Linnaeus 1753). Tritikāles potenciāls ir palicis lielā mērā nerealizēts, un 135 gadu laikā, kopš *A. Stephen Wilson* pirmais sakrustoja kviešus un rudzus, tritikāli galvenokārt izmanto kā dzīvnieku barību. Centieni izaudzēt šķirnes, kas būtu piemērotas maizes cepšanai, ir saskārušies ar grūtībām, lai gan tritikāles miltus var izmantot neraudzētu maizes izstrādājumu cepšanai. Turklāt ir atrastas arī šķirnes, kuru graudu miltus var izmantot maizes cepšanai, bet lielāka interese ir par tritikāles graudu izmantošanu biodegvielas ražošanai (McGoverin *et al.*, 2011; Martinek *et al.*, 2008; Pena, 2004; Tsvetkov and Stoeva, 2003).

No kviešiem ir izolēta peptīdu frakcija ar molmasu 100–1000 Da, kurai pierādīja pretiekaisuma efektu žurkām, kurām kuņģa epitēlijs tika bojāts ar nesteroīdo pretiekaisuma vielu ievadīšanu lielās devas *per os* (Yin *et al.*, 2014). Arī citi autori ir atraduši kviešu peptīdiem antioksidantīvus (Suetsuna and Chen, 2002), antihipertensīvus (Matsui *et al.*, 1999), antibakteriālus (Oita *et al.*, 2000) un — lielākam peptīdam (ap 5000 Da) lunasīnam — pretvēža efektus (Jeong *et al.*, 2007). No kviešiem izdalīta peptīdu frakcija ar pretsāpju darbību (Fukudome and Yoshikawa, 1992). Šie pētījumi parāda, cik daudzpusīgas iedarbības vielas satur kvieši.

Miežiem tautas medicīnā tiek piedēvēti pretiekaisuma un kardiovaskulārie efekti, bet pētījumi, kas to apliecina, publicēti pavisam nesen (Gul *et al.*, 2014). Pētnieki konstatēja, ka miežu graudu ekstraktiem summējas antioksidantu un pretiekaisuma efekti.

Nelielā pētījumā atklāja, ka vīriešiem ar izoperētu prostatas vēzi pēc tam, kad viņi trīs nedēļu garumā ik dienas bija lietojuši pa 295 g rudzu maizes, palielinājās prostatas vēža šūnu

apoptozes indekss, kas norāda uz šo šūnu dzīvotspējas samazināšanos (Bylund *et al.*, 2003). Tika izteikta hipotēze, ka arī rudzi varētu būt funkcionālā uztura produkts. Secinājumi ir iegūti no epidemioloģiskajiem pētījumiem par dažādām diētām. Cho ar līdzautoriem (Cho *et al.*, 2013), analizējot datu bāzes PubMed publikāciju datus par laika posmu no 1965. gada līdz 2010. gadam, secināja, ka pētījumos bieži ir iekļauti produkti, kas neatbilst pilngraudu definīcijai. Tie ir bagātināti ar citām papildvielām, un arī epidemioloģiskajos pētījumos no diētām nav izslēgti citi produkti. Tāpēc, neskatoties uz lielo publikāciju skaitu, ir ļoti maz mērķtiecīgi dizainētu pētījumu par pilngraudu ārstniecisko efektu.

1.3. Lunasīna atklāšana un izplatība augos

Peptīda nosaukums „lunasīns” ir atvasināts no filipīniešu valodas vārda „*lunas*”, kas nozīmē „izārstēt, ārstēt”, un radies, pateicoties lunasīna pētījumos atklātajiem efektiem. Lunasīns nejauši tika atklāts sojas pupās (*Glycine max*), kad 1996. gadā Alfredo Galvezs *Dr. de Lumen's UC Berkeley* laboratorijā mēģināja uzlabot sojas proteīna īpašības. Par lunasīna atklājēju uzskata A. Galvezu, bet proteīna struktūru, kura fragments, kā izrādījās, ir lunasīns, jau bija noskaidrojis Odani ar līdzautoriem (1987), izolējot 2S cDNS, kas kodē ar Met bagātu albumīna proteīnu sojā. Izolētais gēns *Gm2SI* kodē šo ar Met bagāto proteīnu un vēl trīs peptīdus, kurus nosauca par signālpeptīdu (1-21 aminoskābe), lunasīnu (22-64), Gm2S-1 savienojuma peptīdu (65-81) un alizīnu (82-158). Vispirms producējas proproteīns, kas pēc tam tiek šķeltas. Šajā lielajā proproteīnā lunasīns ir 43 aminoskābju ķēdes garš fragments.

Lai gan sākotnēji lunasīns tika atklāts sojas pupās, pētījumi liecina, ka tas ir atrodams arī citos augu valsts avotos, piemēram, graudaugos — kviešos, miežos un rudzos (Hernández-Ledesma and Hsieh, 2013). Šobrīd zināms, ka lunasīnu satur arī medicīnā izmantojami ārstniecības augi, piemēram, amarants (*Amaranthus*) (Silva – Sanchez *et al.*, 2008), lupīna (*Lupinus*) (Hernández-Ledesma and Hsieh, 2013), un daži nakteņu dzimtas augi, bet ne *L. Chinensis* (Jeong *et al.*, 2007 b). Lunasīns identificējams arī sojas produktos pēc pārstrādes, piemēram, tādos produktos kā sojas mērce, tofu un sojas piens (Hernández-Ledesma *et al.*, 2009b; Hernández-Ledesma and Hsieh, 2013). Pētījumos ir analizēts komerciāli pieejams sojas piens, kas izrādās, arī satur lunasīnu. Lunasīna daudzums sojas pienā ir atkarīgs no tā pagatavošanai izmantotā sojas produkta. Tika secināts arī, ka ir iespējams pagatavot ar lunasīnu bagātinātu produktu, ko ikdienā cilvēki varētu lietot profilakses nolūkos (de Meijia *et al.*, 2004).

Būtiski, ka lunasīns ir termostabils — tā struktūra un aktivitāte nemainās pat pēc 10 minūšu ilgas vārīšanas (Park *et al.*, 2005). Tomēr vairākas publikācijas liecina, ka sojas pupiņu pārstrāde ietekmē lunasīna saturu sojas produktos. Komerciāli pieejamā sojas proteīnā lunasīna daudzums ir no 13 līdz 44 mg/g miltu. Ar lunasīnu bagātināti sojas milti saturēja 27,3 mg lunasīna/g miltu, bet ar izoflavoniem piesātināti sojas produkti pēc ekstrahēšanas ar etanolu uzrādīja mazu lunasīna saturu, kas norāda uz slikto lunasīna šķīdību etanolā (de Mejia *et al.*, 2004). Lunasīna koncentrācija ir izmērīta arī attaukotos sojas miltos (5,5 mg lunasīna/g proteīnu), kur tas salīdzinājumā ar sojas izolātu (6,9 mg/ lunasīna/ g proteīnu) un sojas koncentrātu (8,7 līdz 16,5 mg lunasīna/ g proteīnu) bija mazākā daudzumā (Jeong *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2007a). Pētījuma autori parādīja, ka ar ūdeni šķaidīts sojas koncentrāts satur vairāk lunasīna nekā ar spirtu atšķaidītie sojas koncentrāta paraugi. Tātad vislabāk lunasīnu ekstrahēt, kā šķīdinātāju izmantojot ūdeni vai ūdens buferšķīdumu.

Noskaidrots, ka lunasīna koncentrācijas svārstības sojā var ietekmēt dažādi faktori: šķirne vai līnija, sēklu attīstības pakāpe un apkārtējās vides faktori — audzēšanas temperatūra, augsne un mitruma līmenis (de Mejia *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005). Šie faktori ir vērā ņemami, jo liecina, ka iespējams mērķtiecīgi palielināt lunasīna līmeni sojas pupās. Noskaidrots, ka sojas sēklu aizmetņos lunasīns sāk sintezēties 5–6 nedēļas pēc noziedēšanas (0,01 µg/g sēklu) un saglabājas nobriedušās sēklās (0,12 µg/g sēklu) un arī no sojas pupām iegūtos miltos (Park *et al.*, 2005). Piecu dažādu šķirņu sojas pupu paraugos tika noteikts lunasīna saturs, salīdzinot tā līmeni atkarībā no divu dažādu augsnes mitrumu ietekmes un triju dažādu audzēšanas temperatūru ietekmes. Pētījums parādīja, ka lunasīna saturs sojas pupās mainās atkarībā no šķirnes un temperatūras, bet augsnes mitruma līmenis to būtiski neietekmē (Wang *et al.*, 2008). Lunasīna koncentrācija analizētajos paraugos bija 7,5 līdz 10,4 mg/g miltu. ASV šķirnes *Loda*, *Jack* un *Dwight* uzrādīja augstākas koncentrācijas nekā franču *Queen* un *Imari*. Augi, kas tika audzēti augstākā temperatūrā (28 °C), saturēja mazāku lunasīna koncentrāciju kā tie, kas tika audzēti vidējā temperatūras režīmā (23 °C) un zemas temperatūras apstākļos, attiecīgi 8,1 mg/g miltu; 9,2 mg/g miltu un 8,8 mg/g miltu. Nozīmīga sakarība tika atrasta, pa pāriem skatoties, kā lunasīna līmeni ietekmē šķirne un temperatūra vai šķirne un augsnes mitrums. Ar enzīmsaistīto-imūnmetodi (*ELISA*) analizējot 144 dažādas ASV Lauksaimniecības departamenta sojas pupiņu šķirnes, ieguva rezultātus, kas parādīja lielas lunasīna līmeņa svārstības, t. i., no 0,1 g līdz 1,3 g/ 100 g miltu (de Mejia *et al.*, 2004).

Zinātnieki meklēja lunasīna molekulu arī citos augos, un to atrada populāru labību graudos (skatīt 1.3.1. tabulu). Pētījumos tika analizētas dažādas pupiņu šķirnes, graudi un vairāku medicīnā izmantojamu augu un arī medicīnā neizmantotu augu sēklas. Lunasīnu atklāja divos populārākajos labības graudaugos miežos un kviešos (Jeong *et al.*, 2007c; Jeong *et al.*, 2002). Tas netika atrasts nevienā no analizētajiem pākšaugu dzimtas pupiņu ģints (*Phaseolus*) augiem. Silva–Sanchez un kolēģi lunasīnu atrada arī amarantā, kas ir tradicionāls Meksikas augs ar augstu uzturvērtību un medicīnā izmantojamām īpašībām (Silva-Sanchez *et al.*, 2008).

Lunasīna līmenis dažādos augu ekstraktos

Augs (latīniskais nosaukums)	Lunasīna līmenis		Literatūras avots
	mg lunasīns/g proteīnu	mg lunasīns/g sēklu	
Sojas pupas (<i>Glycine max</i>)	4,4-70,5	0,5-8,1	(de Mejia <i>et al.</i> , 2004; Jeong <i>et al.</i> , 2007a)
Mieži (<i>Hordeum vulgare</i>)	5,9- 8,7	0,01-0,02	(Jeong <i>et al.</i> , 2002)
Kvieši (<i>Triticum vulgare</i>)	-	0,2-0,3	(Jeong <i>et al.</i> , 2007a)
Amarants (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	9,5-12,1	-	Silva-Sanchez <i>et al.</i> , 2008
Melnā naktene (<i>Solanum nigrum L.</i>)	36,4	1,8	Jeong <i>et al.</i> , 2007a
Hyyodori- jogo(japāņu nosaukums) <i>Solanum lyratum</i>	22,3	0,4	Jeong <i>et al.</i> , 2007a
Fizāli (<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>Francheti</i>)	17,0	0,1	Jeong <i>et al.</i> , 2007a

Epidemioloģisko pētījumu datos ir atrodama korelācija starp sojas produktu uzņemšanu un veselības uzlabošanu, pārsvarā kardiovaskulāro slimību riska samazinājumu (Anderson *et al.*, 1999) un dažādu vēža veidu, piemēram, prostatas, krūts, plaušu, endometrija un urīnpūšļa vēža riska samazinājumu (Wu *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1997; Jacobsen *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1999; Kolonel *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002). Lai gan Eiropā sojas produktu lietošana pēdējos gados kļūst izplatītāka, tomēr šie produkti vairāk ir iecienīti Āzijas valstīs (Ķīnā, Japānā, Korejā un Taivānā). Šajās valstīs cilvēki patērē 20–80 g dažādu sojas produktu ik dienas (Coward *et al.*, 1993; Wang and Murphy, 1994). Šo produktu uzņemšanu var pielīdzināt 25–100 mg lielam kopējo uzņemto izoflavonu daudzumam (Messina *et al.*, 2006) un 8–50 g sojas proteīna patēriņam (Erdman Jr. *et al.*, 2004). Rietumu tautas uzturā lieto mazāk sojas produktu, vidēji 1–3 gramus dienā, un pārsvarā pārstrādātu produktu formās — sojas dzērienu, brokastu pārslu un citos veidos (Fournier *et al.*, 1998).

1.4. Lunasīna molekulas uzbūve

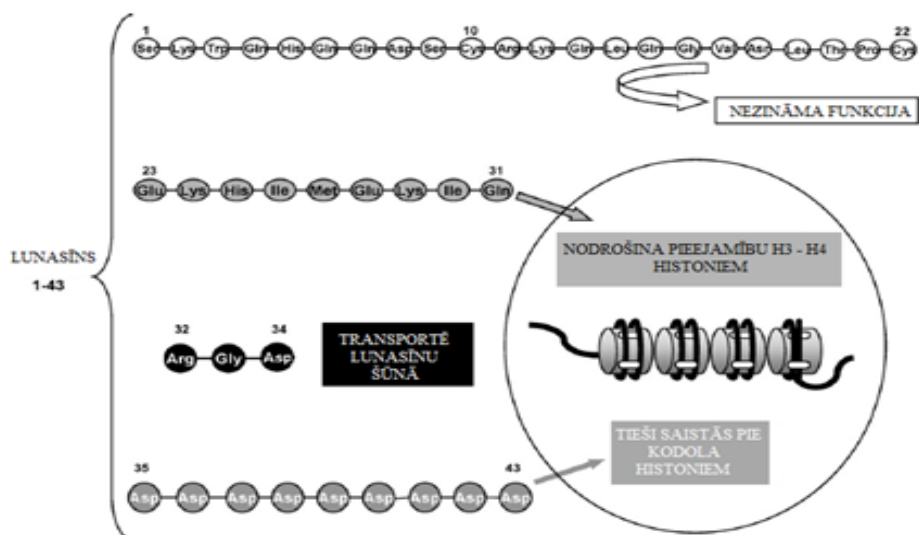
Lunasīns ir peptīds, ko veido 43 aminoskābju ķēde (attēls 1.4.1). Molekulas sastāvā esošās aminoskābes ir ar dažādiem aktīvajiem reģioniem, bet arginīna, glicīna un aspartātskābes atlikums (33-35 aminoskābju ķēde molekulā; saīsināti – RGD reģions) molekulu piesaista šūnām. Tam seko poliaspartātskābes atlikumu reģions, kas sastāv no astoņiem aspartātskābes atlikumiem (saīsināti: peptīda C-gals) (Galvez, *et al.*, 2001).

*Ser-Lys-Trp-Gln-His-Gln-Gln-Asp-Ser-Cys-Arg-Lys-Gln-Leu-Gln-Gly-Val-Asn-Leu-
Glu-Thr-Pro-Cys-Glu-Lys-His-Ile-Met-Glu-Lys-Ile-Gln-Arg-Gly-Asp-
Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp*

1.4.1.attēls. Lunasīna primārā aminoskābju struktūra.

Arg-Gly-Asp (jeb RGD-fragments) reģions atbild par molekulas piesaisti šūnām. Poliaspartātskābes „aste” ir nozīmīga lunasīna bioloģiskai aktivitātei.

Molekulas sekvences ir ar atšķirīgu funkcionālo nozīmi (1.4.2. attēls). Aminoskābju ķēdes fragmenta 1-22 funkcija vēl nav zināma; 23-31 molekulas fragments padara molekulu vieglāk pieejamu hromatīnam. 33-35 (jeb RGD fragments) nodrošina peptīda transportu šūnas kodolā un poliaspartātskābes astei (36-43 fragments) ir atklāts antimitotisks efekts, un tā saistās ar hromatīnu (Hernández – Ledesma *et al.*, 2009c).



1.4.2. attēls. Lunasīna aminoskābju sekvenču funkcionālā nozīme (Hernandez- Ledesma *et al.*, 2008).

Ir pierādīts, ka vairāku peptīdu sastāvā esošais RGD fragments novērš audzēja šūnu metastāzes, piesaistoties pie ekstracelulāro matricu (ECM) integrīniem (Ruoslahti and Pierschbacher, 1986; Akiyama *et al.*, 1995). RGD fragments tiek uzskatīts par ekstracelulārajā matricā esošo integrīna receptoru „atpazīšanas” saitu. Integrīni (heterodimēri receptori) tiek asociēti ar šūnu adhēziju, ekstracelulāro matricu un vēža metastāzēm. 2001. gadā Galvezs un kolēģi mēģināja pierādīt hipotēzi, ka lunasīna gadījumā RGD fragmenta internalizācija šūnu kodolā ir specifiska dažādām šūnu līnijām. Pētījumos tika izmantotas peļu multipotentās cilmes šūnas C3H10T1/2 un peļu embriju fibroblastu šūnu līnija NIH3T3, un tika noskaidrots, ka lunasīns nesaistās pie NIH3T3 šūnām (Galvez *et al.*, 2001). Šie pētījumi parādīja lunasīna potenciālās spējas noteiktā veidā atšķirt šūnas, un vēlāk pierādīja, ka lunasīns īpaši labi saistās ar vēža šūnām. Šie pētījumi apliecināja peptīda pretvēža īpašības un uzlaboja turpmāko pētījumu dizaina izstrādi.

Lunasīna struktūrā ir 43 aminoskābes, un tā molmasa ir apmēram 5 kDa. Lunasīna peptīda struktūra, pierakstot aminoskābes ar viena burtu kodu, ir S K W Q H Q Q D S C R K Q L Q G V N L T P C -EKHIMEKIQG-**RGD-DDDDDDDD**. C-gala struktūra atgādina hromatīna-saistošo proteīnu stabili saglabāto rajonu (*conserved region*) (Park *et al.*, 2005; Galvez *et al.*, 1997; Galvez and de Lumen, 1999; Galvez *et al.*, 2001). Nesen par lunasīna molekulas struktūru izraisījās debātes, jo tika publicēta 44 aminoskābju ķēde (Seber *et al.*,

2012). Tomēr citi autori to nav apstiprinājuši. Sebers ar līdzautoriem rakstīja, ka pēdējā 44. aminoskābe ir asparagīns (N vai ar trīs burtu kodu Asn).

Citas debates ir par lunasīna 14. stāvoklī esošo aminoskābi Lys (K) vai Leu (L). Rizzello un citi (2012) publicēja datus, ka lunasīns varētu rasties fermentēšanas procesā un atrada, ka formula ir SKWQHQQDSCRKQ”K”QGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD, tomēr citi autori uzskata, ka lunasīna sekvence ar kodu AAP62458, ko piešķīris ASV Nacionālais Biotehnoloģijas informācijas centrs, ir ar Leu 14. stāvoklī (Guijarro-Díez *et al.*, 2014). Nav atrasti pierādījumi, ka bioloģiskā aktivitāte atšķirtos peptīdiem ar Lys 14. stāvoklī vai Leu.

Pēc žurku barošanas *per os* ar 240 mg ar lunasīnu bagātināta sojas produkta dzīvnieku asinīs atrada lunasīna monomēru 17,5 ng/mL koncentrācijā, bet no aknām izolētais lunasīns bija dimēra formā, un aknās peptīda līmenis bija 3,1 μg/g. Tomēr *in vitro* un *in vivo* testos monomēra un dimēra aktivitāte neatšķīrās (Hsieh *et al.*, 2010a;b).

Augos ir atrodams lunasīns, bet patlaban tiek meklēti jauni efektīvi un izmaksu ziņā izdevīgi lunasīna iegūšanas veidi, jo sintētiskā lunasīna cena ir visai augsta. Ir publicēta rekombinētā lunasīna iegūšanas metode, kurā, izmantojot T7 ekspresijas sistēmu, lunasīna gēnu ievada *E. coli* baktērijās (Liu and Pan, 2010). Lunasīna gēnu pavairo ar polimerāzes ķēdes (PCR) reakciju un ievieto tajā poli-histidīna (histidīna aminoskābju sekvence) iezīmi pie C- un N-termināļa. Pēc tam gēnu ievieto pET29a plazmīdā un plazmīdas *E. coli* baktērijās. Pēc 4 stundām lunasīna koncentrācija Luria-Bertani barotnē sasniedz 4,73 mg/L. Pārbaudot rekombinētā lunasīna aktivitāti atklājās, ka tas darbojas analogiski sintētiskajam peptīdam un uzrāda tādas pašas īpašības. Prognozējamā molmasa bija 11,35 kDa, kas ir lielāka par lunasīna monomēra molmasu, jo ir pievienotas histidīna aminoskābju iezīmes. Rekombinētais lunasīns izrādījās 92 aminoskābju garš. Tomēr pētnieki nav atraduši izmaiņas bioaktivitātē, salīdzinot ar dabisko 43 aminoskābju garo lunasīnu, un uzskata, ka rekombinētais peptīds uzrāda tādas pašas īpašības (Liu and Pan, 2010).

Lunasīna unikālā struktūra ļāva izteikt pieņēmumu, ka tam piemīt vairākas augiem fizioloģiski nozīmīgas funkcijas (Odani *et al.*, 1987), bet līdz šim neviena no tām tā īsti nav tikusi apstiprināta (Jeong *et al.*, 2002). Meklējot jaunatklātā peptīda līdzību ar citiem, jau zināmiem peptīdiem, konstatēja, ka vislielākā līdzība tam ir ar peļu prolaktīnu, kas pārsteidza pētniekus (Odani *et al.*, 1987). Tomēr līdzība nav tik liela, lai uzskatītu šos proteīnus par radniecīgiem. Prolaktīns ir 197 aminoskābju ķēdes garš peptīds ar trīs disulfīdu tiltiņiem starp Cys: Cys4-Cys9, Cys56-Cys172 un Cys18 -Cys197 (Kohmoto *et al.*, 1984).

Iespējams, ka lunasīnam ir noteikta loma sēklas attīstības un nobriešanas procesā. Pastāv hipotēze, ka lunasīna spēja apturēt vēža šūnu dalīšanos varētu būt nozīmīga šūnu dalīšanās apturēšanā arī augos, tādējādi ierosinot šūnu attīstību un diferenciāciju (Spencer and Higgins, 1981; Jeong *et al.*, 2002). Ir izvirzīta hipotēze par lunasīna lomu sēklu attīstībā. Sēklu angiospermas attīstībā izšķir trīs stadijas: ātra dalīšanās un diferenciācija, šūnu dalīšanās pārtraukšana centrālās parenhīmas šūnās dīgļlapu un angiospermas augiem, kam seko šūnu palielināšanās izmērā, pieaugot ogļhidrātu, proteīnu, lipīdu un nukleīnskābju biosintēzes intensitātei. Nobeigumā sēklas dehidratējas. Tā notiek sēklu attīstība un nobriešana. Otrā fāzē tiek uzskatīta par specifisku angiospermas sēklām, jo notiek DNS endoreplikācija, tas ir, DNS replikācija bez sekojošas šūnu dalīšanās. Endoreplikācija ir process, kurā šūnas ciklā notiek G1 un S fāzes bez sekojošas šūnas dalīšanās, un šī procesa laikā DNS sintēze ir atdalīta no dalīšanās, ļaujot pavairot DNS intensīvākai vielu sintēzei un produktu uzkrāšanai. Lunasīna loma šajā procesā ir endoreplikācijas nodrošināšana, tādā veidā tas aktivē otro sēklu attīstības fāzi. Pēc šīs teorijas visās angiospermas sēklās vajadzētu būt lunasīnam, bet tā tas nav. Līdz ar to šī hipotēze nav pierādīta un secināt, kāda īsti ir lunasīna loma augos, vēl ir par agru (de Lumen, 2005).

Peptīda prognozējamā otrējā struktūra (skat. 1.4.3. attēlu) rāda heliču homoloģiju ar noteiktu reģionu hromatīna saistošo proteīnu – histonu struktūrā (Galvez *et al.*, 2001).



1.4.3. attēls. Iespējamā lunasīna otrējā struktūra.

Lunasīna 3D struktūra joprojām ir pētījumu stadijā. Izmantojot klasisko molekulāro dinamikas simulācijas metodi, secināts, ka lunasīnam ir trīs helices, kuras stiprina aminoskābju atlikumi His⁵-Cys¹⁰, Cys²²-Ile³⁰ un Asp³⁵-Asp⁴¹, bet fragments RGD neuzrāda sekundāro struktūru (Singh and Bisetty, 2012). Pētnieki saskatīja, ka 3D struktūrā N un C gali peptīdam

var būt savijušies dažādās helicēs un RGD fragmentam ir nozīme to savīšanā un atbrīvošanā. Jaunākajā Latvijas pētnieku publikācijā aprakstīta jauna rekombinētā lunasīna ražošanas metode, kas ļauj efektīvi ar izotopu iezīmēt lunasīnu kodolmagnētiskās rezonanses (KMR) pētījumiem (Aleksis *et al.*, 2016). Sākotnējie KMR pētījumi parādīja, ka lunasīns var pastāvēt reducētā un oksidētā stāvoklī ar intramolekulāru disulfīdu saiti atkarībā no šķīduma. Abu peptīda formu struktūru pie pH 3,5 un 6,5 raksturoja ar cirkulārā dihroisma spektroskopijas un daudzdimensiju KMR metodēm. Dati liecināja, ka lunasīns pieder pie nestrukturēto proteīnu klases. Sekundāro struktūru analīze liecina par divu spirālveida reģionu un pagarināta beta palaga (*beta sheet*) elementa (*beta strand*) esamību pie C-gala. Autori pieņem, ka, mijiedarbojoties ar histoniem H3 un H4, sekundārās struktūras elementi varētu īslaicīgi nostabilizēties. Jaunatklātās lunasīna redoksi īpašības varētu izskaidrot tā antioksidanta un pretiekaisuma darbību (Aleksis *et al.*, 2016).

Lunasīna peptīds var veidot dimērus, trimērus un heksamērus, bet pagaidām to loma nav līdz galam izpētīta (De Mejia *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2010a). Izmantojot lunasīna poliklonālās antivielas, gēlā novēro divas joslas, vienu pie 5,45 kDa un vienu pie 13 kDa. Tātad arī dimērs saistās ar lunasīna poliklonālajām antivielām. Hidrolizēts proteīns un izolāts arī parāda joslu virs 5,45 kDa. Zinātnieki pieļauj, ka 16 kDa atbilst lunasīna trimēram un 30 kDa josla varētu atbilst heksamēram. 2010. gadā, pētot lunasīnu miežos, pētnieki izolēja iespējamu lunasīna dimēru ar molmasu 9 kDa, kas kopā ar lunasīna monomēro molekulu tika izdalīts no žurku nierēm un aknām. Farmakoloģiskais efekts dimēram un sintētiskajam lunasīnam bija ļoti līdzīgs (Jeong *et al.*, 2010). Dimērs ir ļoti termoizturīgs, jo saglabā sākotnēju bioaktivitāti pat pēc 5 min ilgās vārīšanas 100 °C temperatūrā (de Lumen, 2005).

1.5. Lunasīna bioloģiskā aktivitāte

1.5.1. Lunasīna pretvēža efekti

Pirmoreiz lunasīna bioloģiskā aktivitāte tika pierādīta 1999. gadā. Pētījuma autori Galvezs un de Lumens parādīja, ka lunasīna ekspresija zīdītāju šūnās (eksperimentiem tika izmantotas cilvēka MCF-7 krūts vēža šūnas, peļu hepatomas šūnas Hepa 1c1c7 un peļu embrionālo fibroblastu CEH 10T1/2 šūnas) inhibē šūnu mitozī un izraisa vēža šūnu hromosomu fragmentāciju un apoptozi (Galvez, *et al.*, 1999). Turklāt šie pētnieki parādīja, ka lunasīns ietekmē šūnu vārpstveida šķiedru veidošanos un primāri piesaistās histonu proteīniem.

Lunasīna pretvēža darbība ir daudzpusīga. Lunasīns inhibē vēža šūnu mitozī, bet nav toksisks normālām šūnām vai pētniecībā izmantotajām vēža šūnu līnijām. Šīs šūnas lunasīna klātbūtnē aug un dalās, bet tās šūnas, kuras ir ierosinātas ar karcinogēniem, pārstāj dalīties, un tām novēro apoptozi. Šādu novērojumu ir daudz un dažādās šūnu līnijās (Jones and Srivastava, 2014; Lam *et al.*, 2003; Galvez *et al.*, 2012; Dia *et al.*, 2011a; Pabona *et al.*, 2013). Brīdī, kad šūnas nedalās, kodola serdes (*core*) histoni ir deacetilētā stāvoklī. Histoni acetilējas un atbrīvo hromatīnu, kas iniciē transkripciju. Ja acetilēšanās process ir traucēts, šūna to tulko kā nenormālu situāciju, un kā atbildes reakciju šūnas pašas veic apoptozi. Lunasīns konkurē ar histonu acetiltransferāzēm (HAT) par saistīšanos pie histoniem. Ja piesaistītos HAT, sāktos transkripcija, producētos mitozes S fāzes proteīni (piemēram, DNS polimerāze alfa) un notiktu mitoze. Ja pie deacetilētiem histoniem ir piesaistījies lunasīns, process nenotiek. Autori (de Lumen, 2005) nosauca lunasīnu par “sargsuni” (*watchdog*), kas gaida transformāciju un inhibē tikai transformētu šūnu replikāciju. Ciklīn-atkarīgās kināzes (*Cyclin-dependent kinases* – CDKs) kontrolē šūnu ciklu, un zems inhibitoru p21 un p27 līmenis ir transformētu šūnu pazīme. Lunasīns paaugstina p21 un p27 ekspresiju un aptur kolorektālā vēža (Lam *et al.*, 2003; Dia *et al.*, 2011a) un peļu embriju fibroblastu šūnu dalīšanos G2/M fāzē (Lam *et al.*, 2003; Dia *et al.*, 2011a). Angiogēnēzi un metastāzes bieži izraisa ekstracelulārās matricēs (ECM) degradācija. Lunasīns regulē daudzu ar ECM un adhēziju saistītu gēnu aktivāciju un tai sekojošu atbilstošu proteīnu ekspresiju. Piemēram, metaloproteāzes 10 ekspresija ir kritisks moments plaušu vēža progresēšanā, un lunasīns 7,7 reizes samazina šī gēna regulēto proteīnu ekspresiju (Jones and Srivastava, 2014). Eksogēni pievienojot lunasīnu zīdītāju šūnām, tas internalizējas un lokalizējas kodolā, kur piesaistās pie deacetilētiem serdes histoniem (H3 un H4) un no koncentrācijas atkarīgā veidā inhibē to acetilēšanos. Jau 10 nM koncentrācijā novērojama lunasīna histonu acetilēšanās inhibīcija par 25%, bet 1 μM koncentrācijā — par 80% (Galvez *et al.*, 2001; de Lumen, 2005; Lam *et al.*, 2003). Jaunāks pētījums ar cilvēka krūts vēža šūnām parādīja, ka lunasīns dod lielāku HATs inhibējošo efektu nekā citi pretvēža savienojumi (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Balasubramanyam *et al.*, 2004).

Uzskata, ka lunasīnam ir epigēnētisks darbības mehānisms. Jeongs un kolēģi parādīja, ka tas konkurē ar dažādiem histonu acetiltransferāžu enzīmiem—PCAF, CBP un GCN5 — inhibējot histonu acetilēšanos un nomācot šūnu cikla progresiju (Jeong *et al.*, 2002; Jeong 2007b). Uzskata, ka neregulētai HATs aktivitātei (piemēram, pārlietu liela enzīmu ekspresija) ir nozīmīga loma dažādos cilvēka audzēju veidos (Gayther *et al.*, 2000). Vēža attīstībā epigēnētiskās modifikācijas iedarbojas uz signāltransdukcijas ceļiem. Gēnu

transkripcijas aktivācija un hromatīna sairšana raksturo acetilēšanu (Dalvai and Bystricky, 2010). Epiģenētiskās izmaiņas raksturo ar vismaz trīs faktoriem: DNS metilēšanu, histonu modifikāciju un nekodējošo ncRNS-asociēto gēnu klusināšanu (*silencing*) (Holliday, 2006). Ieviestais termins “epigenoms” nozīmē to, ka atšķirībā no genoma, kurā gēni ir tādi, kādi ir un veic konkrētu darbību, epigenoms piesaistās gēniem un nosaka vai izmaina gēna darbību. Embrija attīstības periodā šūnas attīstās un specializējas, pateicoties epiģenētiskām instrukcijām. Bērnībā epigenoms paliek elastīgs un uztver apkārtnes un diētas izmaiņas, ko nodod tālāk gēniem. Pieaugušo vecumā apkārtējās vides ietekmētais epigenoms rada iedzimtību nākošajai paaudzei. Vēlīnā pieaugušo vecumā epigenoms pasargā vai attālina slimības un uzlabo dzīves kvalitāti, ja to regulē ar pareizi izvēlētiem apkārtējās vides un barības faktoriem.

Lunasīnam tika pierādīta spēja inhibēt histonu acetilāciju ar ķīmisku karcinogēnu un/vai vīrusa onkogēnu inducētu zīdītāju šūnās. Inducētajās šūnās novēro audzēja supresējošo proteīnu (RB, p52 un pp32) nomākumu. Lunasīns, piesaistoties šūnas kodolam, darbojas kā audzēja supresora aizstājējs, un pats peptīds saistās ar deacetilētiem histoniem un izjauc balansu starp acetilēšanu-deacetilēšanu, kas noved pie šūnas bojāejas (de Lumen, 2005). *In vitro* eksperimenti ar šūnu kultūrām parādīja, ka lunasīns samazina zīdītāju šūnu transformāciju pēc ierosināšanas ar ķīmiskajiem karcinogēniem, neietekmējot normālo šūnu proliferāciju. Lunasīns supresē audzēja šūnas 7.12 – dimetilbenz[a] antracēna (DMBA) un 3- metilholantrēna (MCA)- inducētās C3H10T1/2 šūnās (Galvez *et al.*, 2001). Pētījumā ar DMBA inducētām NIH3T3 šūnām tika parādīti līdzīgi rezultāti (Hsieh *et al.*, 2011). Lunasīnam šis efekts ir izteiktāks, salīdzinot ar BBI uzrādītajiem rezultātiem. Arī transformējot eksperimentā izvēlētas šūnas ar onkogēniem un gēniem, kas inaktivē audzēja nomācošos proteīnus, vairāki pētnieki eksperimentos ir pierādījuši lunasīna efektus C3H10T1/2 un NIH3T3 šūnās (Galvez *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2003). Ras onkogēni vairākās cilvēka vēža šūnās bieži ir aktīvā formā, kas ir nozīmīgi Ras/mitogēna (MAPK) aktivētās proteīnkināzes signālkaskādē, kurai ir būtiska nozīme šūnu izdzīvošanā, nāvē, proliferācijā un diferenciācijā (Malumbres and Barbacid, 2003). Lunasīnam tika pierādīta spēja samazināt NIH3T3 šūnu transformāciju, kuras eksperimentā tika transfektētas ar ierosinātu ras-onkogēna formu (Jeong *et al.*, 2003). Lunasīna pievienošana peļu fibroblastu šūnām NIH3T3, kas transfektētas ar vīrusa onkogēnu E1A, parādīja, ka lunasīns nomāc vēža šūnu veidošanos un samazina proteīna p21 līmeni (Lam *et al.*, 2003). Vīrusa onkogēns E1A tiek asociēts ar cilvēka audzējiem, jo tas organismā inaktivē tumorsupresējošo retinoblastomas proteīnu (RB), izraisot šūnu cikla pārrāvumu un šūnu transformāciju (Helt and Galloway, 2003).

2009. gadā tika veikts pētījums, kurā secināja, ka no attaukotiem sojas miltiem attīrīts lunasīns ir toksisks pret dažādiem cilvēka resnās zarnu vēža šūnu veidiem (Dia *et al.*, 2009). Šis pētījums parādīja lunasīna pretvēža aktivitāti uz vēža šūnām, kas jau ir izveidojušās. Vēlāk *in vitro* tika noteikts, ka tas izraisa citotoksicitāti četrās dažādās vēža šūnu līnijās (KM12L4, RKO, HCT-116 un HT29) ar šādām IC₅₀ vērtībām: attiecīgi 13,0 μM; 21,6 μM; 26,3 μM un 61,7 μM (Dia and de Mejia, 2011a). Secināja, ka lunasīnam ir izteikts potenciāls nogalināt KM12L4 zarnu audzēja šūnas, kas ir vienas no agresīvākajām vēža šūnām ar augstu metastāžu pakāpi, salīdzinot ar pārējām šūnu līnijām, kas tika izmantotas eksperimentā. KM12L4 zarnu vēža šūnu līnijas paraugos p21 un p27 proteīnu ekspresija pēc lunasīna pievienošanas bija paaugstināta (*up-regulated*), kā arī HT29 šūnu paraugos p21 proteīna ekspresija vienlaicīgi ar šūnu cikla apturēšanu G2/M fāzē bija palielināta.

Hsieh ar kolēģiem parādīja, ka lunasīns, no devas atkarīgā veidā, inhibē estrogēnneatkarīga krūts vēža šūnu augšanu (IC₅₀ = 181 μM) (Hsieh *et al.*, 2010c). Tika noteikta arī lunasīna struktūras C- gala (21 aminoskābi saturoša sekvenca) aktivitāte, kas tiek uzskatīta par galveno, lai inhibētu krūts vēža šūnu proliferāciju. Noskaidroja, ka C gala peptīda IC₅₀ ir 138 μM (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Tātad C gala peptīds ir nedaudz aktīvāks par pilnu lunasīna molekulu.

In vivo testos izmantoja ar lunasīnu bagātinātu diētu, ar kuru baroja ar 7.12 – dimetilbenz[a] antracēnu stimulētas eksperimentālās peles, un novēroja, ka lunasīns uzrāda būtisku inhibējošu efektu uz krūts audzēju attīstību (Hsieh *et al.*, 2010a). Eksperimenti lunasīna pretvēža aktivitātes noteikšanā *in vivo* sākotnēji parādīja, ka eksogēnas sintētiskā lunasīna aplikācijas izraisa ādas audzēja samazināšanos SENCAR līnijas pelēm (Galvez *et al.*, 2001). Galvezs un kolēģi noteica lunasīna pretvēža aktivitāti *in vivo* peļu modelī, dažādās devās liekot lunasīnu uz ādas aplikāciju veidā. Rezultātā novēroja, ka devā 250 μg/pelei nedēļā tas samazina ķīmisko karcinogēnu ietekmi uz ādu, samazinot ādas vēža rašanos par 70%. Novēroja, ka lunasīna profilaktiskie efekti izpaudās arī uz papilomas rašanos kairinājuma vietās — lunasīns to par 2 nedēļām attālināja (Galvez *et al.*, 2001). Lunasīns palēnināja eksperimenta peļu ādas epidermas šūnu dalīšanos salīdzinājumā ar kontroles grupas peļu ādas paraugiem (Hsieh *et al.*, 2004).

Jeongs ar līdzautoriem pirmie parādīja, ka lunasīns, kas tika izolēts no sojas pupiņām, inhibēja Ras-onkogēna izraisītu koloniju veidošanos un kodola H3 histonu acetilēšanos. Citos pētījumos parādīts, ka tas inhibē arī vīrusu onkogēnu, piemēram, E1A, izraisīto zīdītāju šūnu

transformāciju un koloniju veidošanos un, inaktivējot tumoru supresējošo proteīnu, inducē šūnu proliferāciju (Lam *et al.*, 2003).

Minētie pētījumi pierāda, ka lunasīns ir aktīvāks pret tiem vēža veidiem, kas notiek ar hromatīna modifikācijām. Histonu deacetilāzei (HDAC) noturēt histonus deacetilētā veidā palīdz Rb, iedarbojoties uz E2F promoteri. Rb-HDAC komplekss sabrūk, onkoproteīnam E1A inaktivējot Rb. Acetilēšanai ar HATs kļūst pieejami deacetilētie histoni. Šajā brīdī parādās lunasīna efekti, jo tas konkurē ar HATs un piesaistās pie deacetilētajiem histoniem. Gēnu transkripcija tiek bloķēta un šūnās notiek apoptoze (Jeong *et al.*, 2007a; Jeong *et al.*, 2007b). Tomēr mehānisms, kā tieši lunasīns inhibē histonu acetilēšanos, nav īsti skaidrs. Domā, ka lunasīns saistās pie deacetilētā histona ar negatīvi lādēto poli-D ķēdīti peptīda molekulas C-galā, jo, ja šo fragmentu noņem, tad antimitotiskie lunasīna efekti pazūd. Peptīda N-galam varētu būt nozīme deacetilēto histonu atrašanai. Paaugstināts $\alpha 5\beta 1$ integrīna līmenis tiek saistīts ar paaugstinātu kolorektālā vēža šūnu invazitāti, bet pazemināts, pretēji, samazina metastāzes. Lunasīns samazina $\alpha 5$ integrīnu ekspresiju, un tas pierāda lunasīna kā antimetastātiskas molekulas lomu (Dia *et al.*, 2011a; Jones and Srivastava, 2014). Vēža šūnās apmēram puse epigenoma ir izregulējies un nespēj funkcionēt tā, lai gēni fizioloģiski plānoti funkcionētu, tāpēc uzskata, ka lunasīnam un tam līdzīga darbības mehānisma vielām ir liels pretvēža darbības potenciāls. Tomēr visi minētie lunasīna pretvēža efekti ir pētīti *in vitro* un trūkst *in vivo* pierādījumu, ka lunasīnam varētu būt vērā ņemama darbība klīnikā. Kā vienkāršākais *in vivo* organisms lunasīna izpētei ir ieteikta augļu mušiņa *Drosophila* (Jones and Srivastava, 2014). Augļu mušiņas genoms ir vienkāršs, un tai ir 8–10 dienu dzīves cikls, kas ļauj īsā laikā izpētīt daudzas paaudzes.

1.5.2. Pretiekaisuma un imunomodulējošā darbība

Oksidatīvais stress un iekaisums ir viskritiskākie riska faktori deģeneratīvo un karcinogēno slimību attīstībā. Lai noskaidrotu, vai lunasīnam ir pretiekaisuma efekti, to pārbaudīja iekaisuma modelī RAW 264.7 makrofāgu šūnu līnijā (Hernández- Ledesma, *et al.*, 2009a). Iekaisuma modeli radīja ar baktēriju lipopolisaharīdiem (LPS). Izrādījās, ka šajā modelī lunasīns 10–50 μM koncentrācijā uzrāda antioksidanta un pretiekaisuma efektus. Lunasīns ar dažādām IC_{50} koncentrācijām inhibēja daudzu citokīnu sekrēciju. Piemēram, tumora nekrozes faktora alfa un interleikīna- 6 sekrēciju lunasīns inhibēja ar IC_{50} 2 μM koncentrācijā,

interleikīna IL-1 β producēšanos — ar IC₅₀ 13 μ M koncentrācijā, kodola nukleārā faktora NF-kappaB translokāciju kodolā — ar IC₅₀ 21 μ M koncentrācijā, ciklooksigenāzes 2 (COX-2) un inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes (iNOS) ekspresiju — ar IC₅₀ 25-37 μ M koncentrācijā, prostaglandīnu E2 producēšanos — ar IC₅₀ 41 μ M koncentrācijā un p65 un p50 proteīnu nukleāro translokāciju — ar IC₅₀ 48–77 μ M koncentrācijā. Šie pētījumi apliecina no koncentrācijas atkarīgu plaša spektra lunasīna pretiekaisuma darbību (de Mejia and Dia, 2009). Lunasīnam raksturīga pretiekaisuma darbība, ko raksturo slāpekļa oksīda, tumor-nekrozes faktora alfa, interleikīna IL-1 β un slāpekļa oksīda producēšanās nomākšana (Jones and Srivastava, 2014). THP-1 makrofāgu līnijā lunasīns pretiekaisuma iedarbību uzrāda, inhibējot AKT mediēto NF- κ B ceļu (Cam *et al.*, 2012). Autori pierādīja, ka šis lunasīna efekts notiek mijiedarbībā ar α V β 3 integrīnu ceļu, kas ir saistīts ar iekaisuma ceļu, piemēram, Akt / NF- κ B, aktivēšanu. Turklāt α V β 3 integrīns ir iesaistīts makrofāgu agregācijā iekaisuma laikā. Aguzzi ar kolēģiem (2010) pierādīja, ka α V β 3 integrīns piesaistās pie Arg-Gly-Asp (RGD) motīva lunasīna molekulā un lunasīns, pateicoties šim RGD fragmentam, varētu kavēt pro-iekaisuma ceļus, mijiedarbojoties ar α V β 3 integrīnu.

Pretiekaisuma darbība cieši saistīta ar antioksidantu aktivitāti, kas lunasīnam pierādīta *in vitro* testos. Lunasīns „uzķer” peroksil- un superoksīdu radikāļus (García-Nebot *et al.*, 2014) un koncentrācijā 0,5–25 μ M pēc 24 h pasargā cilvēku Caco-2 šūnu līniju no ūdeņraža peroksīda un tertbutilhidroperoksīda bojājumiem.

1.5.3. Holesterīna līmeni samazinošā darbība

Sojas produkti kā funkcionālais uzturs jau kopš seniem laikiem ieteikti kardiovaskulāro saslimšanu risku novēršanai. Nesen atklātais lunasīns un tā noskaidrotais sarežģītais darbības mehānisms pamato līdz šim tikai ieteikuma formā noformulēto sojas produktu vērtību. Lunasīns specifiski saistās pie histona H3 un nomāc H3-lizīns¹⁴ acetilēšanu, piedaloties vienai no histonu acetiltransferāzēm (PCAF). HMG Co-A reduktāze ir holesterīna biosintēzi regulējošs enzīms, kura gēna transkripcijas aktivēšanai vajadzīga H3 acetilēšana ar PCAF. Lunasīns, nobloķējot vienas no histonu acetiltransferāzēm (PCAF) specifisko histonu saistīšanās pozīciju, nomāc H3 histona acetilēšanu. PCAF sauc arī par P300/CBP-asociēto faktoru, bet CBP un p300 ir kodola proteīni, kuri saista daudzus par šūnu augšanu un diferencēšanos faktoros atbildīgus faktoros, tostarp c-jun un adenovirālo onkogēnu E1A

(Hernández-Ledesma *et al.*, 2009a). Lunasīns samazina holesterīna saturu, jo inhibē 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzīma-A (HMG-CoA) reduktāzes gēna ekspresiju un līdz ar to samazina HMG-CoA enzīma līmeni, kas tālāk nozīmē pazeminātu aknu spēju sintezēt holesterīnu. Lunasīns samazina HMG-CoA reduktāzes ekspresiju HepG2 aknu šūnās. Vesternblota un reālā laika poliķēdes reakcijas (RT-PCR) metodes parādīja, ka lunasīna klātbūtne palielina zema blīvuma lipoproteīnu (ZBL) receptoru ekspresiju, kas izraisa palielinātu plazmas ZBL holesterīna klīrensu. Lunasīns pastiprina zema blīvuma lipoproteīnu receptoru gēna ekspresiju un receptoru proteīna producēšanos, jo lunasīna klātbūtnē divas reizes palielinās SP1 proteīna (ZBL receptoru producēšanai nepieciešamā sterolu regulatorā elementa saistīšanas proteīna (sterol regulatory element binding (SREBP) koaktivators)) līmenis. Tālāk paaugstinātais ZBL receptoru skaits pastiprināti attīra asinis no zema blīvuma lipoproteīnu kompleksa ar holesterīnu (Lule *et al.*, 2015).

Apmēram 70-80% holesterīna sintezējas aknās, tāpēc ir svarīgi iedarboties aknu šūnās uz holesterīna sintēzes agrīnu stadiju. Šajā ziņā lunasīns darbojas agrāk kā statīni, kuri bloķē HMG-CoA enzīmu aktivitāti. Šo blokādi ir grūti noregulēt, un statīniem aprakstīti nopietni blakus efekti pārliecīga holesterīna sintēzes nomākuma dēļ. Holesterīns ir vajadzīgs šūnu normālai funkcionēšanai — gan membrānu integritātei, gan hormonu sintēzei.

Lai noskaidrotu lunasīna efektivitāti *in vivo*, tika iegūts ar lunasīnu bagātināts sojas ekstrakts (LSE), kas saturēja 100–200 reižu vairāk bioaktīvā lunasīna nekā sojas proteīni. Ar LSE baroja piecas cūkas, kurām ZBL receptoru gēnu mutācijas dēļ bija augsts ZBL holesterīna līmenis. Iepriekš cūkas bija barotas ar kazeīna bāzes diētām, un pēc divām nedēļām to uzturs tika papildināts ar 250 mg LSE ik dienas astoņu nedēļu garumā. Asins un lipīdu analīžu rezultāti parādīja, ka kazeīna uzturs palielina ZBL holesterīna līmeni ZBL receptoru mutantu cūkām vidēji par 6,7%, bet 250 mg LSE pēc 4 un 8 nedēļas ilgas lietošanas samazināja ZBL holesterīna līmeni attiecīgi par 8,6% un 6,4%. Šie rezultāti liecina, ka lunasīns ir sojas proteīnu aktīva uzturviela, kas atbild par ZBL holesterīna līmeņa pazemināšanu, un tā darbības mehānisms ir noskaidrots (Galvez, 2012).

ASV ir izstrādāti un reģistrēti uztura bagātinātāji holesterīna līmeņa samazināšanai, kuru sastāvā ir no ģenētiski nemodificētas sojas attīrīts lunasīns. Viena kapsula “Nova Joint” satur tikpat daudz lunasīna cik 50 g sojas proteīna, bet bez lunasīna tajā vēl ir bosvēlijas ekstrakts, kurkumīns, olīvu lapu ekstrakts, hialuronskābe un citas vielas. Šis uztura bagātinātājs tiek rekomendēts kā pretiekaisuma līdzeklis (<http://www.novajoint.com/>). Uzņēmums “Reliv

International” ražo “Luna Rich”, “Reliv Now” un “Luna Rich X”, ko rekomendē kā dabīgus līdzekļus holesterīna līmeņa pazemināšanai, un tie tiek dēvēti par uztura epiģenētiķiem (<https://reliv.com/lunasin>).

1.6. Lunasīna biopieejamība

Sešas stundas pēc uzņemšanas *per os* eksperimenta dzīvniekos tiek absorbēti ap 35 % ar tritiju iezīmēta lunasīna, un tas izplatās daudzos organisma audos. Novērots, ka asinīs un aknās nonākušais lunasīns nav metabolizējies un, izolējot no aknām vai asinīm, tas ir bioloģiski aktīvs *in vitro* testos (Jeong *et al.*, 2007a). Līdzīgs eksperiments tika veikts arī 2010. gadā ar CD-1 pelēm. Hsieh ar līdzautoriem iezīmēja sintētisko lunasīnu ar tritiju un noteica biopieejamību pēc perorālas uzņemšanas. Konstatēja, ka lunasīns ir nonācis plaušās, piena dziedzeros, prostatā un smadzenēs (Hsieh *et al.*, 2010a). Salīdzinot sintezētā un no sojas izdalītā lunasīna biopieejamību, *in vitro* testos pētnieki mērīja lunasīna koncentrāciju asinīs un aknu paraugos un secināja, ka vienādās devās lietots dabīgais un sintētiskais lunasīns ir bioaktīvs un var nomākt audzēja veidošanos.

Meklējot jaunas zāļu vielas, ir būtiski panākt, lai organismā nonākusī viela pēc *per os* uzņemšanas būtu stabila un nonāktu audos neizmainītā veidā. Tādēļ tiek noteiktas potenciālās zāļu vielas īpašības: spēja saglabāt stabilitāti kuņģa skābajā vidē, nesašķelties enzīmu ietekmē, pēc uzsūkšanās nonākt mērķorgānos neizmainītā veidā un šķērsot hematoencefālisko barjeru. Lai noteiktu lunasīna biopieejamību, tika veikts eksperiments, kurā iesaistīja piecus brīvprātīgus vīriešus (18–25 gadus veci), kas 5 dienas pēc kārtas ik dienas apēda 50 g sojas proteīna. Viņiem analizēja asinīs sastāvu pirms eksperimenta, kā arī 30 minūtes un vienu stundu pēc devas uzņemšanas. Lunasīna noteikšanai asinīs izmantoja jonu apmaiņas hromatogrāfiju, bet lunasīna izolēšanai no asinīm izmantoja magnētiskās lodītes un pēc tam ar kvantitatīvās noteikšanas metodi ELISA izmērīja lunasīna daudzumu. Eksperimenta beigās (piektajā eksperimenta dienā) lunasīna koncentrācija plazmā bija 50,2–110,6 ng/ml ($66,0 \pm 25,4$ ng/ml), 30 min pēc proteīna uzņemšanas — 33,5–122,7 ng/ml, bet pēc 1 stundas – 71,0 \pm 32,8 ng/ml. No asinīm varēja izolēt aptuveni 4,5% lunasīna, kas ir vidēji 2,2–7,8% no kopējā uzņemtā proteīnu daudzuma. Ar šo eksperimentu pierādīja, ka lunasīns no pārtikas nonāk asinīs un uzsūcas audos neizmainītā veidā. Uzskata, ka sojas pupās esošie BBI un citi proteāžu inhibitori pasargā lunasīnu no sašķelšanas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2009c; Park *et al.*, 2005; 2007b). Lunasīna stabilitāte pierādīta arī *in vitro* testos ar pepsīnu un pankreatīnu (Jeong *et al.*, 2009).

Lunasīna bioaktivitāte organismā norāda uz to, ka lunasīnu saturošiem pārtikas produktiem varētu būt profilakses līdzekļu īpašības.

Tomēr līdz šim ir publicēts ļoti maz datu par lunasīna klīnisko novērojumu vai klīnisko pētījumu rezultātiem.

1.7. Lunasīna ietekme uz peļu uzvedību un smadzeņu dopamīnerģisko sistēmu

Cilvēku un dzīvnieku pētījumos ir pierādīts, ka lunasīns nonāk smadzenēs (Hsieh *et al.*, 2010a), un šie pētījumi ir rosinājuši pētīt, kāds varētu būt lunasīna iedarbības veids uz centrālo nervu sistēmu (CNS). Līdz šim lunasīna ietekme uz centrālo nervu sistēmu ir maz pētīta: publicēti tikai viena pētījuma rezultāti (Dzirkale *et al.*, 2013). Injicējot lunasīnu intracisternāli peļu C57BL/6 tēviņiem, novēroja neiroleptisku un kataleptisku efektu. Izmantojot references vielas amfetamīnu un apomorfīnu ar zināmu efektu uz dopamīnerģisko sistēmu, noskaidroja, ka lunasīns ievērojami samazina amfetamīna izraisīto lokomotorās aktivitātes pieaugumu un samazināja apomorfīna izraisīto kāpelēšanas uzvedību (Dzirkale *et al.*, 2013). Pētījumā netika novērota ietekme uz ketamīna un bikukulīna izraisītajām peļu uzvedības reakcijām. Ar dopamīna D1 receptora gēnu transfektētās šūnās tika atrasta neliela lunasīna afinitāte ($K_i = 60 \pm 15 \mu\text{M}$), bet netika pierādīta saistīšanās pie D2 receptoriem. Iegūtie dati liecināja, ka lunasīna darbība CNS vismaz daļēji ir saistīta ar dopamīnerģisko D1 receptoru ceļiem. Turpmākie lunasīna centrālās darbības pētījumi ir daudzsoļi, īpaši ņemot vērā to, ka ir liela nepieciešamība pēc jauna veida antipsihotiskiem līdzekļiem.

1.8. Lunasīna mijiedarbība ar zāļu vielām

Domājot par lunasīnu saturošu uztura bagātinātāju lietošanu kopā ar zālēm, ir veikti daži pētījumi. Tika parādīts, ka lunasīns potencē aspirīna darbību vai aspirīns potencē lunasīna darbību, bet kombinētā veidā tie uzrādīja karcinoģenēzi inhibējošu efektu NIH/3T3 šūnu kultūrās (Hsieh *et al.*, 2011). Iekaisumam ir negatīva loma arī kardiovaskulāro slimību izcelsmē, un lunasīnam ir paaugstināta spēja internalizēties šūnās iekaisuma apstākļos. Pētot, kā iekaisuma modelī lunasīns internalizējas THP-1 makrofāgu šūnās, noskaidroja, ka nistatīns ($54 \mu\text{M}$) samazina lunasīna internalizēšanos šūnās un ka lunasīna iekļūšanu šūnas pasliktina arī amantadīns un amilorīds, kuri inhibē klatrīna mediēto endocitozi (Cam *et al.*, 2013). Tomēr mijiedarbības pētījumu ir maz.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Reaģenti

- Sintētiskais lunasīns tika nopirkts no Caslo ApS (Medicinske Laboratorier, peptide synthesis Technologies, Dānija).
- Graudu un kartupeļu šķirnes un līnijas tika saņemtas no Priekuļu laukaugu selekcijas institūta un Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūta pētniekiem.
- Laboratorijas dzīvnieku pārtikas granulas, sērijas 30290 un 29429. Barības maisījums grauzējiem, ekstrudēts (SIA Straume, Latvija). Granulu sastāvs: kukurūza, kvieši, sojas spraukumi, lopbarības raugs, zivju milti, pārstrādāts dzīvnieku proteīns, kalcija karbonāts, nātrijs hlorīds. Piedevas ir vitamīni, minerālvielas. Analītiskie komponenti: kopējais proteīns 20%, koptauki 3%, kokšķiedra 3%, koppelni 6%, kalcijns 0,7%, fosfors 0,4%, nātrijs 0,26%, metionīns+ cisteīns 0,6%, lizīns 0,9%.
- Fosfātu, nātrijs hlorīda buferis (PBS) (Sigma)
- Proteāžu kokteilis (Sigma)
- Heksāns (Sigma)
- Dejonizēts ūdens, H₂O (Millipore MilliQ-plus)
- Skudrskābe (Fluka, 99%)
- Trifluoretiķskābe (Fluka, 99%)
- Acetonitrils (Sigma)
- Metanols (Sigma)
- Reaģentu komplekts (*Protein quantification kit* (Dojindo Molecular Technologies, INC, PQ02-10 Dojindo), kurā ietilpst: WST-8 šķīdums, standartalbumīna šķīdums 10 mg/ml un fosfātu, nātrijs hlorīda (PBS) buferis.
- 2,2-difenil-1-pikrillhidrazilradikāls (DPPH) (Sigma)
- Glutaciona peroksidāzes aktivitātes (GPx) mērīšanas komplekts Nr 703102. Cayman Chemical Company, Ann. Arbor, MI
- Cilvēka embrija nieru šūnu līnija HEK 293 (ASV, ATCC, Manassas, VA, kataloga Nr CRL-1573)
- Dulbecco modificētā Eagle barotne (DMEM) (Sigma)
- Liellopu embrija serums (LES) (Sigma)
- Antibiotiku maisījums 100 vienības / ml penicilīna un 100 g / ml streptomicīna (Sigma)

- 3-(4,5-di,metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijs bromīds (MTT) (Sigma)
- Liellopu seruma albumīns (BSA) (Sigma)
- Tripsīna/EDTA šķīdums (Sigma)
- Dimetilsulfoksīds (DMSO) (Sigma)

2.2. Materiāli

- 96 lauciņu plates
- Pipetes ar maināmu tilpumu 10 µl un 200 µl
- Daudzkanālu pipetes
- 1000 ml koniskās kolbas
- Centrifūgas stobriņi 15 ml un 50 ml
- Ependorfa tipa mēģenes
- Magnēti
- Filtrpapīra filtri
- Cietfāzes ekstrakcijas kolonnas Strata X 3ml, 60 mg (Phenomenex)
- Hromatogrāfijas kolonnas:

Phenomenex Synergi Hydro-RP 4µm, 2,0x150mm

2.3. Aparatūra

- 1) Elektriskās dzirnaviņas *Falling Number Laboratory Mill* 3100 ar 0,5 mm sietu
- 2) Analītiskie svāri (*PRECISA XB 220A* ($\pm 0,0001$ g)
- 3) Laboratorijas svāri
- 4) Magnētiskais maisītājs
- 5) Vortex tipa maisītājs
- 6) Termostats
- 7) Šūnu inkubators
- 8) Laminārs
- 9) AEŠH iekārta *Waters 2690 Alliance* ar kolonnas un parauga termostatu, nepārtrauktu kustīgās fāzes degaēšanas iekārtu, automātisko paraugu injicēšanas iekārtu

- 10) Masas spektrometrs *Waters Quattro MicroTM API* ar elektroizsmidzināšanas jonizāciju, kā izsmidzināmo gāzi izmantojot slāpekli
- 11) Mikroplates lasītājs (elx 808, Biotek Instruments, Inc) ar Gen5 programmatūru
- 12) Apgrieztas gaismas fāzu kontrasta mikroskops (Leica, Solms, Vācija).

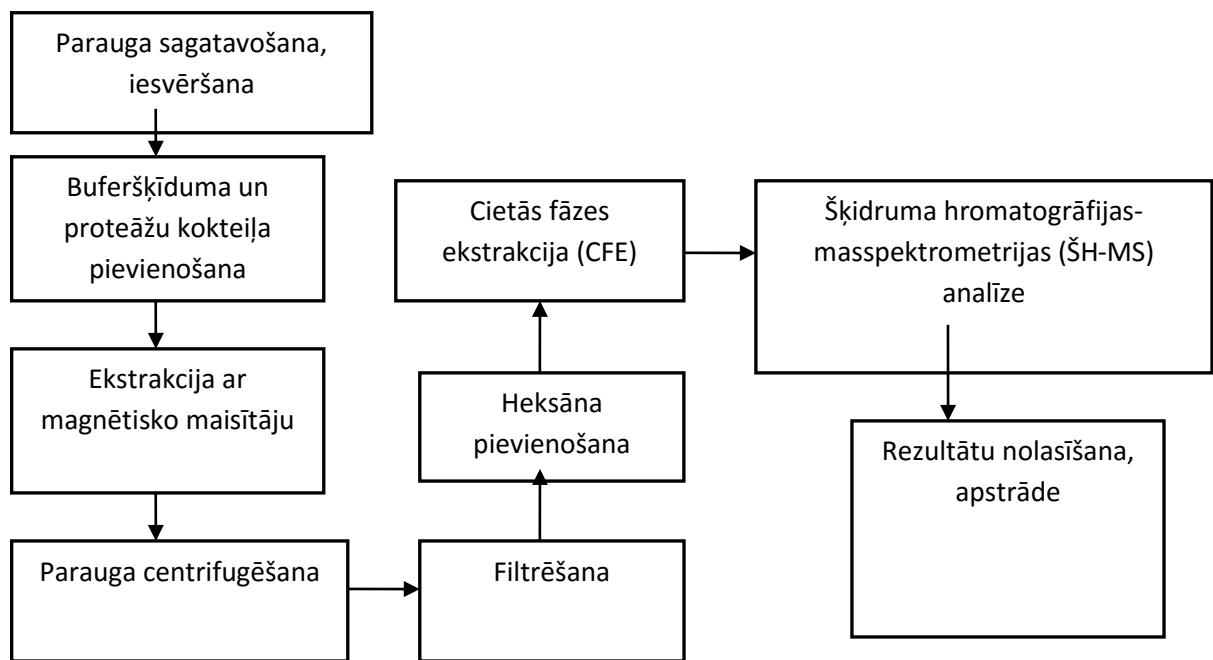
2.4. Lunasīna ekstrahēšana no graudiem, sēklām un kartupeļiem

- Nosver 4 g miltu vai kartupeļu bumbuļu masas un ieber 50 ml koniskā kolbiņā
- Pievieno attiecībā pret iesvaru 1:10 ml 0,1 M fosfātu, nātrija hlorīda (PBS) bufera
- Pievieno 0,1% dažādu proteāžu kokteiļa (Sigma)
- Ievieto atbilstoša lieluma magnētu
- Ekstrahē 48 h, novietojot kolbu uz magnētiskā maisītāja
- Ekstraktu nolej no miltu nogulsnēm 50 ml centrifūgas stobriņos
- Centrifugē 20 min 3000 apgr./min
- Supernatantu filtrē caur papīra filtriem
- 2 ml iegūtā izfiltrētā ekstrakta izmanto proteīnu daudzuma mērīšanai ar WST-8 reaģentu komplektu.
- Atlikušajam filtrātam pievieno 50 ml heksāna, spēcīgi krata 5 min
- Noņem augšējo heksāna slāni un 20 ml iegūtā ekstrakta izmanto cietās fāzes ekstrakcijā.

2.5. Cietās fāzes ekstrakcija

- Sagatavo cietās fāzes ekstrakcijas (CFE) kārtidžu, laižot caur 3 ml metanola un pēc tam 3 ml dejonizēta ūdens.
- Uznes parauga ekstraktu.
- Skalo kārtidžu ar 3 ml 0,1 % skudrskābes šķīduma dejonizētā ūdenī.
- Eluē lunasīnu ar 2 ml 0,1% trifluoretiķskābes šķīduma 50 % acetonitrila šķīdumā.
- Iegūto ekstraktu atšķaida ar kustīgo fāzi "A" attiecībā 1:1.
- Pēc cietās fāzes ekstrakcijas veic šķīduma hromatogrāfiju un masspektrometriju.

Shematisks metodes attēlojums parādīts 2.5.1. attēlā.



2.5.1. attēls. Lunasīna ekstrakcijas shēma.

2.6. Standartšķiduma pagatavošana

Pagatavo lunasīna pamata standartšķidumu. Iesver 2 mg lunasīna standartvielas un izšķīdina 50 mL dejonizēta ūdens. Iegūtā standartšķiduma koncentrācija ir 40 µg/mL.

2.7. Lunasīna noteikšanas šķidrums hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode

Augsti efektīvai šķidrums hromatogrāfijas masspektrometrijas tandēma (AEŠH/MS/MS) analītiskajai metodei ir raksturīgs ļoti augsts jutīgums un specifiskums. Tā apvieno fizisku vielu maisījuma nodalīšanu ar šķidrums hromatogrāfijas palīdzību un vielas masas analīzi ar masspektrometrijas palīdzību. Kvadrupolu protonētais lunasīna molekulārais jons tika uztverts ar viena jona pierakstīšanu (single-ion recording (SIR)). Masas spektrs tika iegūts ar tandēmmasspektrometriju (MS/MS) jeb trīskāršo kvadrupolu masspektrometru, kas bija papildināts ar elektroizsmidzināšanas avotu (ESI). Analīze tika veikta pozitīvo jonu režīmā.

Šķidrums hromatogrāfijas – masspektrometrijas apstākļi:

- spriegums uz kapilāra - 3kV;
- spriegums uz paraugu konusa - 60 V;
- jonu avota temperatūra - 120 °C;
- desolvācijas temperatūra - 250 °C ;
- izvēlēto jonu pieraksta režīms (SIR) - detektē jonu ar m/z 1258;
- kolonna - *Phenomenex Synergi Hydro-RP 4µm, 2,0x150mm*;
- kustīgās fāzes – **A:**0,1% trifluoretiķskābe ūdenī; **B:**0,1% trifluoretiķskābe acetonitrilā (2.7.1. tabula);
- kustīgās fāzes plūsmas ātrums – 0,3 ml/min;
- kolonnas temperatūra – 30 °C;
- Injekcijas tilpums 50 µl

Gradianta režīms

Laiks, min	Kustīgā fāze A, %	Kustīgā fāze B, %
0	80	20
8	40	60
11	40	60
12	80	20
20	80	20

Vispirms tika veikta izstrādātās metodes validācija. Noteicām šādus parametrus: linearitāti, metodes specifiskumu, detektēšanas un kvalitatīvās noteikšanas robežas, atgūstamību.

Detektēšanas un kvalitatīvas noteikšanas robeža. Hromatogrāfijā detektēšanas robeža ir vielas koncentrācija paraugā, kuras hromatogrāfiskās joslas signāla un trokšņa attiecība ir 3. Kvalitatīvās noteikšanas robežai šī attiecība ir 10. Šos lielumus aprēķinājām pēc formulām:

$$LOD = \frac{C \cdot 3}{S/N} \quad LOQ = \frac{C \cdot 10}{S/N}, \quad (1.\text{formula})$$

Apzīmējumi:

LOD – detektēšanas robeža

LOQ – kvantitatīvās noteikšanas robeža

C – zemākā kalibrācijas punkta koncentrācija

S/N – signāla un trokšņa attiecība zemākajam kalibrācijas punktam.

Atgūstamība. Atgūstamību nosaka, analizējot paraugu ar zināmu lunasīna koncentrāciju un aprēķinot koncentrāciju pēc kalibrācijas grafika. Atgūstamību aprēķinājām pēc formulas:

$$Atgustamiba = \frac{C_{apr}}{C_{par}} \cdot 100\% , \quad (2.formula)$$

Apzīmējumi:

C_{apr} - aprēķinātā parauga koncentrācija

C_{par} - patiesā parauga koncentrācija



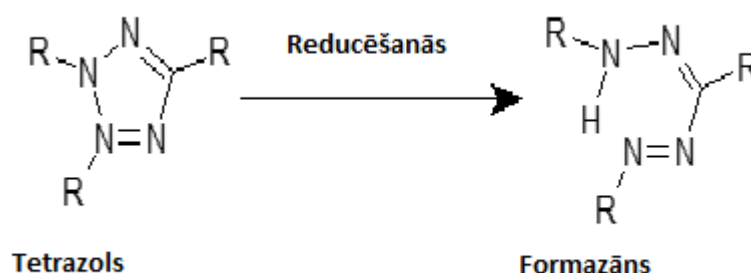
2.7.1. attēls. Augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas modulis un masspektrometrs.

2.8. Lunasīna koncentrācijas aprēķini

Lunasīna koncentrāciju nosaka ar augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas-masspektrometrijas tandēma metodi (AEŠH-MS/MS), izmantojot standartpiedevu metodi. Veic paraugu pagatavošanu paraugiem, kuriem pievienots zināms daudzums lunasīna standartšķīduma. Šos paraugus izmanto, lai konstruētu kalibrēšanas grafiku. Kalibrēšanas grafiku veido no ne mazāk kā pieciem punktiem, iekļaujot arī 0 punktu. No iegūtā kalibrēšanas taisnes vienādojuma aprēķina paraugos esošo lunasīna koncentrāciju.

2.9. Proteīnu daudzuma noteikšana

Proteīnu koncentrāciju noteicām ar reaģentu komplektu *Protein quantification kit* (Dojindo Molecular Technologies, INC). Proteīna kvantitatīvai noteikšanai izmantojām 96 lauciņu mikroplates. Krāsu reakcija ir balstīta uz šķīstoša tetrazola sāls WST-8 reakciju ar proteīniem, kuras rezultātā veidojas formazāns (2.9.1. attēls). WST-8 formazāna krāsa ir dzeltena pie neitrālas pH vērtības, bet pie augstākas (sārmainākas) pH vērtības tā kļūst zila. Lineāra standartlīkne ir no proteīnu koncentrācijas 50 µg/ml līdz 5 mg/ml.



2.9.1.att. **Tetrazola reducēšanās par formazānu.** „R” apzīmē dažādas grupas, kuras var būt tetrazola sāļi.

Kā standartu izmantojām liellopa seruma albumīnu (BSA) atšķaidījumos 1:2, sākot no 1 mg/ml. Atšķaidot divas reizes, ieguvām katru nākamo koncentrāciju. Katrā lauciņā iemēra 180 µl bufera. Pievieno 20 µl BSA atšķaidījuma, katru koncentrāciju triplikātos. Pārējos lauciņos triplikātos pievieno pa 20 µl no katra graudu miltu ekstrakta. Samaisa. Visos lauciņos pievieno 20 µl WST-8 šķīduma. Samaisa. Inkubē plati 37 C° 30 min tumšā vietā. Pēc tam mikroplašu lasītājā (*Tecan*) nolasa optisko blīvumu (OD) pie 630–670 nm. Pēc kalibrācijas līknes izrēķina proteīnu koncentrāciju paraugā. Visus eksperimentus atkārtojam trīs reizes ar paralēliem mērījumiem.

2.10. Antioksidantu aktivitātes noteikšana

Dabas vielu antioksidatīvās aktivitātes noteikšanai literatūrā aprakstītas vairākas metodes: ar DPPH (Cheeseman and Slater, 1993; Brand-Williams, Cuvelier, and Berset, 1995;

Tsai *et al.*, 2009), β -karotīna atkrāsošana (BCB) (Pratt, 1980), TBARS (tiobarbiturātskābes substanču noteikšana) (Ruberto & Baratta, 2000) un glutaciona peroksidāzes aktivitātes noteikšana (GPx). Mēs lunasīna antioksidantu aktivitātes noteikšanai izvēlējāmies divas tālāk aprakstītās metodes (skatīt 2.10.1. un 2.10.2. apakšpunktu).

2.10.1. Brīvā 2,2-difenil-1-pikrillhidrazilradikāļa (DPPH) koncentrācijas samazināšanas metode

Ar AEŠH no auzu ekstrakta izolētam un attīrītam lunasīnam (acetonitrils: ūdens 1: 1) noteicām koncentrāciju saskaņā ar sintētiskā lunasīna standarta zināmas koncentrācijas līkni. Sintētisko lunasīnu un no auzām izolēto lunasīnu atšķaidījām ar ūdeni 0,1; 1; 10 un 100 μ M koncentrācijā un pārbaudījām brīvā 2,2-difenil-1-pikrillhidrazilradikāļa (DPPH) koncentrācijas samazināšanas testā saskaņā ar publicēto metodi (Tsai *et al.*, 2009). DPPH šķīdums tika sagatavots metanolā, turpretī acetonitrils tika izmantots kā šķīdinātāja kontrole no auzām ekstrahētajam lunasīnam. Katrā 96 lauciņu plātes iedobē ar pipeti pipetē 25 μ l parauga, kam pievieno 175 μ L 0,15 mM DPPH metanola šķīduma. Plati 20 sekundes sakrata un 30 minūtes atstāj tumsā uz ledus.

Ja viela reaģē ar DPPH, tad purpursārtā krāsa mainās uz dzeltenu vai kļūst pavisam bezkrāsaina. Absorbciju nolasiņām spektrofotometriski pie 517 nm ar Bio-Tek, PowerwaveX340, Boston, MA aparātu. Lunasīna iedarbība tika aprēķināta % pēc formulas: $((A_{DPPH} - A_{reaģenti}) - (A_{paraugs} - A_{paraugs/reaģenti})) / (A_{DPPH} - A_{tukšs}) \times 100$, kur A_{DPPH} ir DPPH šķīduma absorbcija, $A_{reaģenti}$ ir metanola absorbcija, $A_{paraugs}$ ir DPPH plus parauga ar lunasīnu absorbcija un $A_{paraugs/reaģenti}$ ir metanola plus lunasīna absorbcija.

2.10.2. Glutaciona peroksidāzes aktivitātes mērīšana

Glutaciona peroksidāzes aktivitāti (GPx) mērījām ar glutaciona peroksidāzes testa komplektu (Cayman Chemical, kit number 703102). HEK 293 šūnas 60 mm šūnu audzēšanas plātes audzējām 2 h sintētiskā un no auzām izolētā lunasīna 0,1; 1; 10 un 50 μ M koncentrāciju klātbūtnē. Tad šūnas tika novāktas, izmantojot gumijas skrāpi. Iegūto šūnu masu homogenizējām aukstā testa buferī, kas ir ražotāja reaģentu komplektā (*assay buffer*). Pēc tam

šūnas centrifugējām 10000 x g 15 min 4° C temperatūrā un izmantojām supernatantu enzīma aktivitātes mērīšanai saskaņā ar ražotāja instrukciju. Supernatantu pārnes uz 96 lauciņu plati. Enzimātiskā reakcija tika uzsākta, pievienojot 20 µL relatīvi stabila organiskā peroksīda — kumilhidroperoksīda (C₉H₁₂O₂) — un pēc tam 96 lauciņu mikroplati sakratīja 20 sekundes. Absorbciņu mērījām ik pēc 1 minūtes 5 min laikā pie 340 nm, un GPx aktivitāti aprēķinājām nmol / min / mL.

2.11. Šūnu kultivēšana

Cilvēka embrija nieru šūnu līnija HEK 293 tika audzēta Dulbecco modificētajā Eagle barotnē (DMEM), kas papildināta ar 10% liellopu embrija serumu, 100 vienībām/ ml penicilīna un 100 g / ml streptomīcīna. Šūnas audzējām CO₂ šūnu inkubatorā 37° C temperatūrā, līdz tās sasniedza konfluenci (kad šūnas pārklāja 80–90% no flakona virsmas). Tad šūnas ar tripsīna/EDTA šķīduma palīdzību tika savāktas un ar pipeti pārsētas 96 lauciņu platēs. Šūnu proliferācijas un citoksicitātes eksperimenti tika veikti atbilstoši katra eksperimenta dizainam.

2.12. Šūnu proliferācijas pārbaude

HEK 293 šūnām pievienojām sintētisko un no auzām izolēto lunasīnu koncentrācijā 0,1; 1; 10; 50 un 100 µM. Pēc 24 stundām atsūcām šūnu barotni un katrā 96 lauciņu plates lauciņā pievienojām 10 µL 3-(4,5-di,metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīda (MTT) šķīduma (5 mg/ ml nātrija fosfāta un nātrija hlorīda (PBS) buferī) un inkubējām šūnas 2 h 37 °C temperatūrā 5% CO₂ atmosfērā šūnu inkubatorā. Dzīvo šūnu mitohondriju enzīmu darbības rezultātā veidojas nešķīstoši formazāna kristāli. Plati nocentrifugē un šūnas mazgā ar PBS. Tad pievieno 100 µL dimetilsulfoksīda (DMSO), lai izšķīdinātu formazāna kristālus. Pēc tam 30 min maisa un nomēra absorbciņu pie 560 nm, izmantojot mikroplates lasītāju (elx 808, Biotek Instruments, Inc). Rezultātus aprēķinājām ar Gen5 programmatūru. Eksperimenti tika veikti trīs reizes ar trīs paralēliem mērījumiem. Dzīvo šūnu skaitu izteicām procentos no šūnu kontroles skaita, ko pieņem par 100%. Papildus novērojām šūnu morfoloģiju ar apgrieztas gaismas fāzu kontrasta mikroskopu (Leica, Solms, Vācija).

Datu aprēķināšana

Lunasīna koncentrāciju izrēķina pēc standartlīknes, izmantojot datu apstrādes sistēmu *MasLynx 4.1*. Statistikas aprēķiniem izmanto datorprogrammas GraphPad Prism 6.00 un MS Excel. Rezultāti uzskatīti par ticamiem, ja $p \leq 0,05$. Dati tika aprēķināti pēc mērījumu veikšanas 3 paraugos un attēloti kā vidējais \pm standartnovirze (SD). Daudzfaktoru statistiskajai analīzei pielietots divfaktoru ANOVA tests. Fenotipiskās korelācijas koeficienti tika aprēķināti pēc lunasīna vērtībām abos kultivēšanas veidos (bioloģiskais un konvencionālais) un starp lunasīna saturu un augu raksturojošām iezīmēm, kas noteiktas kā lunasīnu ietekmējošie faktori (piemēram, graudu raža, 1000 graudu svars, graudu izmēra svars un proteīnu daudzums augā).

Plašāka analīze veikta, pielietojot šādu formulu:

$$h^2 = 100 V_g / (V_g + V_{gs}/s + V_e/sr), \quad (3.\text{formula})$$

kur: V_g — genotipiskās izmaiņas;

V_{gs} — genotipa izmaiņas \times menedžmenta sistēmas mijiedarbība;

V_e — kļūdas izmaiņas;

r — replikātu skaits;

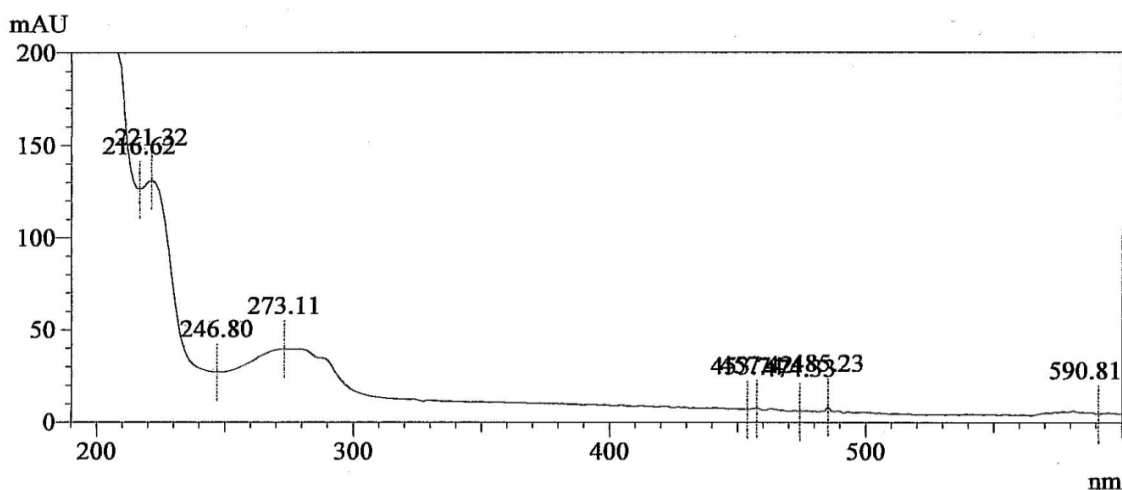
s — menedžmenta sistēmu skaits.

3. REZULTĀTI

3.1. Lunasīna identitātes un kvantitatīvās noteikšanas metodes optimizācija un validācija

Sākotnēji lunasīna izolēšanas un pierādīšanas metodes tika izstrādātas soļi. Tās bija jonu apmaiņas hromatogrāfija, ultrafiltrācija, daļiņu lieluma nošķiršanas hromatogrāfija un imunoafinitātes hromatogrāfija, bet lunasīna identitāti pierādīja ar westernblotu, izmantojot monoklonālās un poliklonālās antivielas pret lunasīna C gala termināli (Dia *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). Lunasīna noteikšana augos sastāv no trim stadijām: proteīnu ekstrakcijas no auga, proteīnu atdalīšanas, lunasīna analīzes (identificēšanas vai/un kvantificēšanas). Lunasīnam ir liela molmasa, kas ierobežo masas spektrometru izmantošanu, jo lielākajai daļai standarta masas spektrometru, ko izmanto laboratorijās, mērīšanas diapazons ir līdz 2000 Da. Lai būtu iespējams izmantot šāda veida aprīkojumu, jāveic lunasīna derivatizācija. Par derivatizācijas reaģentu izmanto tripsīnu. Derivatizācijas rezultātā iegūst peptīdus ar mazāku molekulmasu, un tos var analizēt ar masas spektrometru.

Šīs metodes ir sarežģītas un laikietilpīgas, protokolu izpildei ir nepieciešams specifisks aprīkojums un prasmes. Mēs kā pirmie ieviesām cietfāzes ekstrakciju lunasīna attīrīšanai un atdalīšanai no traucējošiem savienojumiem. Cietfāzes ekstrakcija ir ātrāka un lētāka paraugu sagatavošanas un attīrīšanas metode. Lunasīna identificēšanai un noteikšanai izmantojām augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas un masas spektrometrijas tandēma metodi. Lai veiksmīgi varētu izmantot maspektrometru ar mērīšanas diapazonu līdz 2000 Da, elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā ieguvām molekulāros jonus ar vairākiem lādiņiem, tādējādi samazinot m/z vērtību. Salīdzinājām lunasīna detektēšanas iespējas, izmantojot fotodiožu matricas detektoru un masas spektrometru, lai atrastu piemērotākos apstākļus lunasīna noteikšanai. Sintētiskā lunasīna standartšķīdumu ievadījām hromatogrāfa sistēmā ar fotodiožu matricas detektoru un uzņēmām pilnu UV absorbcijas spektru robežās no 190 līdz 600 nm (3.1.1. attēls).



3.1.1.attēls. Lunasīna UV absorbcijas spektrs.

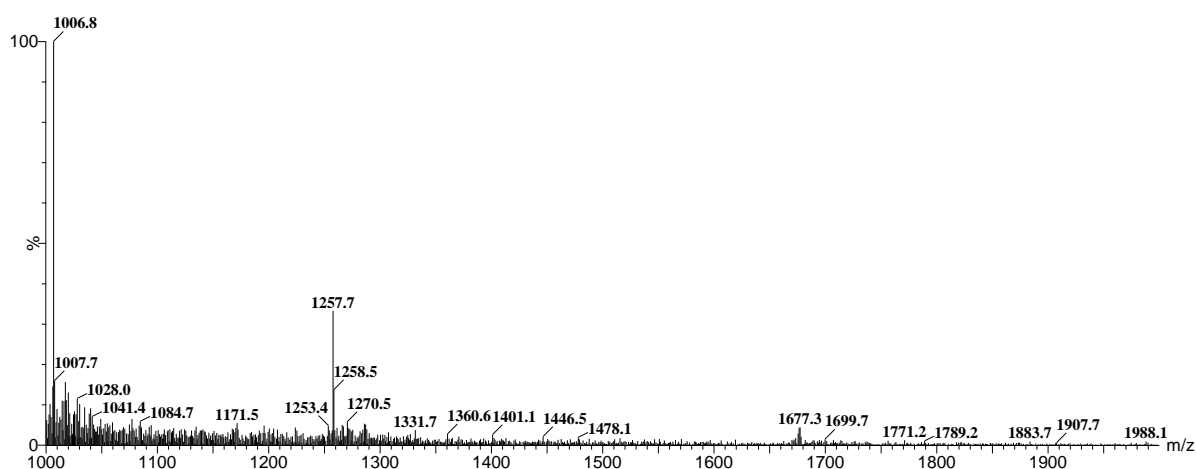
Novērojām, ka peptīdam lunasīnam ir izteikts absorbcijas maksimums pie 210 nm un 273 nm. Pie viļņa garuma, kas ir mazāks par 210 nm, absorbē izmantotie šķīdinātāji — metanols un acetonitrils. Tādēļ, lai būtu augstāka selektivitāte, lunasīna analīzēm izmantojām UV detektoru pie viļņu garuma 273 nm. Tomēr secinājām, ka UV detektora izmantošana nav piemērota metode lunasīna kvantitatīvai noteikšanai.

Lai noteiktu lunasīna daudzumu ar masas spektrometru, nepieciešams iegūt vairāk lādētus molekulāros jonus. Lunasīnam šādus jonus ir iespējams iegūt, jo molekulas sastāvā ir vairāki heteroatomi, pie kuriem elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā var piesaistīties protoni. Šādu jonu masa un masas un lādiņa attiecības parādītas 3.1.1. tabulā. Kā redzams, lunasīna molekulārajiem joniem, kuriem ir vairāk par diviem lādiņiem, masas un lādiņa attiecība ir mazāka par 2000 Da, un tas nozīmē, ka lunasīnu ir iespējams detektēt ar masas spektrometru.

Lunasīna galveno lādēto molekulāro jonu masas un lādiņa attiecība

$M+H_n$	n	m/z
5030	1	5030
5031	2	2515
5032	3	1677
5033	4	1258
5034	5	1007

Masas spektru ieguvām elektroizsmidzināšanas jonizācijas pozitīvajā režīmā. Visintensīvākos lunasīna molekulārā jona signālus ieguvām pie kapilāra sprieguma 3 kV un paraugu konusa sprieguma 60 V. Lunasīna standartšķīduma masas spektrs tika pierakstīts diapazonā no 1000 līdz 2000 m/z. Iegūtajā masas spektrā (3.1.2. attēls) intensīvāko signālu dod molekulārais jons ar 5 lādiņiem, kas atbilst jonam ar m/z 1007 (3.1.1. tabula). Spektrā labi redzams arī lunasīna molekulārais jons ar 4 lādiņiem, kas atbilst m/z 1258. Secinājām, ka abus šos jonus ar m/z 1007 un 1258 iespējams izmantot lunasīna koncentrācijas mērījumiem un reizē identitātes pierādīšanai.



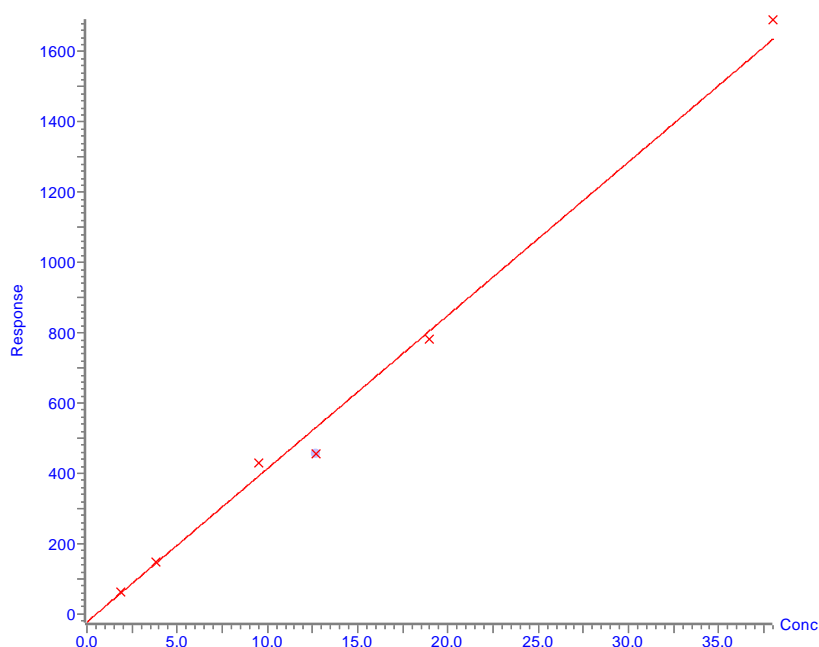
3.1.2.attēls. Lunasīna masas spektrs.

AEŠH analizē veicām izvēlētajā jona pierakstu (*selected ion regimen* (SIR)), palielinot metodes selektivitāti un mazinot paraugu matricas ietekmi uz analīzi.

Metodes validācijai novērtējām linearitāti, specifiskumu, mērīšanas robežas un atgūstamību.

Linearitāte. Linearitāti noteicām, veicot hromatogrāfisko analīzi standartšķīdumam 1,9; 3,8; 9,5; 12,7; 19; 38 µg/ml koncentrācijā. Kalibrēšanas grafiks attēlo joslas laukuma un lunasīna koncentrācijas sakarību (3.1.3. attēls).

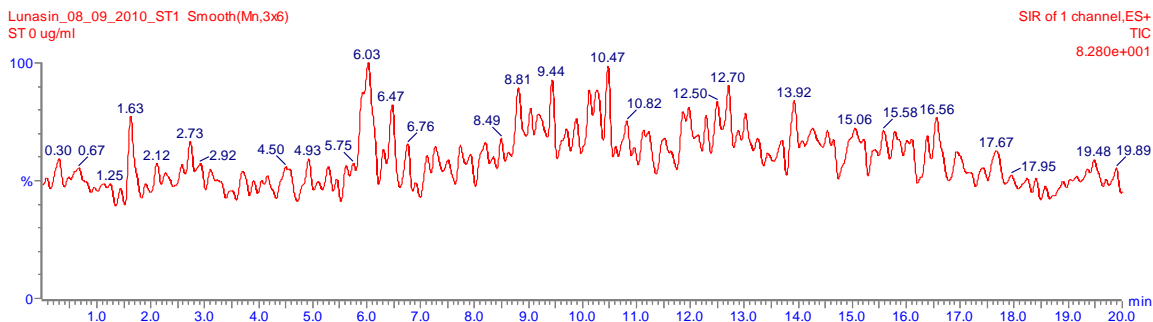
Compound name: Lunasins
Correlation coefficient: $r = 0.996245$, $r^2 = 0.992504$
Calibration curve: $43.6267 * x + -22.7041$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



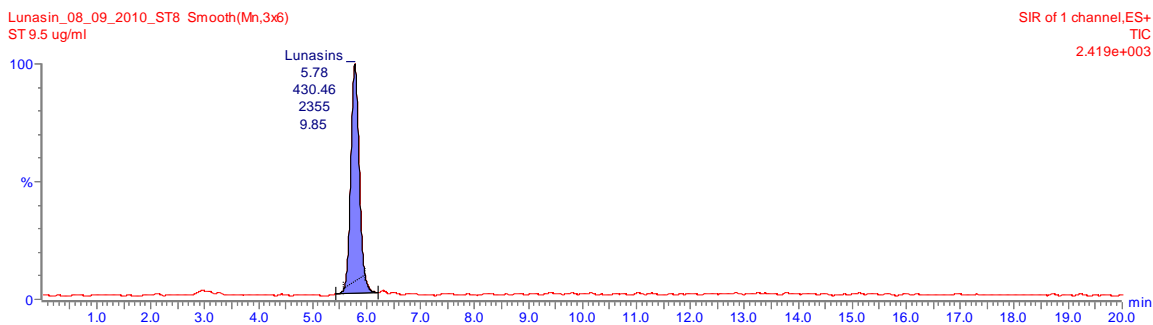
3.1.3. attēls. Lunasīna kalibrēšanas grafiks.

Metodes specifiskums. Metodes specifiskumu raksturo tas, vai paraugā, kas nesatur lunasīnu, nav traucējošu joslu. Iegūtie dati liecina, ka bez lunasīna parauga hromatogrammā nav joslu, kas varētu ietekmēt lunasīna analīzi. Visos paraugos ar lunasīnu redzējām hromatogrammas smailes. Attēls 3.1.4. parāda parauga ar lunasīna koncentrāciju 9,5 µg/ml hromatogrammu.

Tukšais paraugs



Paraugs ar lunasīna koncentrāciju 9,5 µg/ml



3.1.4. attēls. Tukšā parauga un lunasīnu saturoša parauga hromatogrammas.

Validācijas rezultāti apkopoti tabulā 3.1.2.

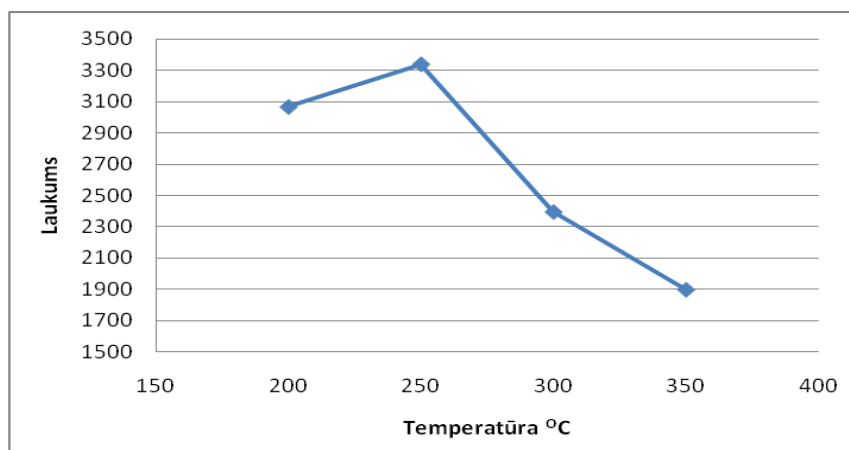
3.1.2.tabula

Lunasīna noteikšanas metodes validācijas rezultāti

Validācijas parametrs	Rezultāts
<i>Linearitāte</i>	Linearitātes apgabals: 0-38 µg/ml, $R^2=0,992$
<i>Metodes specifiskums</i>	Metode ir specifiska, tukšajā paraugā nav joslu, kas ietekmē lunasīna noteikšanu

<i>Detektēšanas robeža</i>	0,3 µg/ml
<i>Kvantitatīvās noteikšanas robeža</i>	1 mg/ml
<i>Atgūstamība</i>	100,3 %

Bez noskaidrotajiem masas spektrometra detektēšanas parametriem: kā sprieguma uz kapilāra 3kV, sprieguma uz paraugu konusa 60 V, jonu avota temperatūras 120 °C, un izvēlēto jonu pieraksta režīma, detektējot jonus ar m/z 1007 un 1258, vēl bija jānoskaidro piemērotākā desolvācijas temperatūra. Pagatavoto standartšķīdumu ievadījām masas spektrometrā un mainījām desolvācijas temperatūru no 200 līdz 350 °C. Iegūtās joslas laukums atkarībā no desolvācijas temperatūras ir mainīgs, bet 3.1.5. attēlā redzams, ka vispiemērotākā desolvācijas temperatūra ir 250 °C.



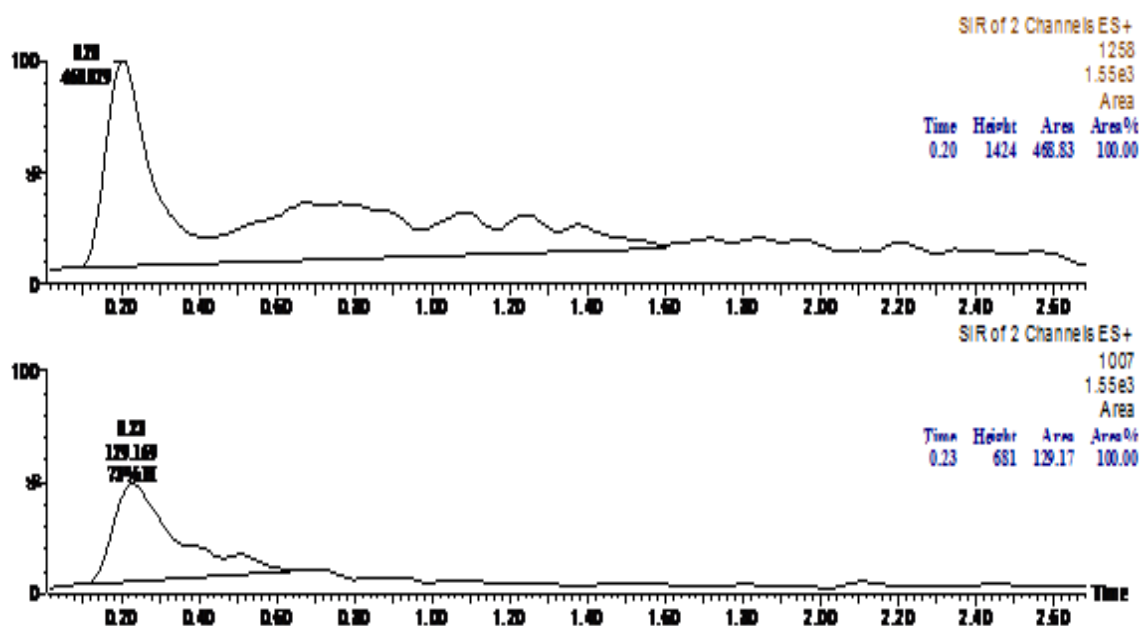
3.1.5.attēls. Desolvācijas temperatūras ietekme uz lunasīna joslas laukumu.

Veicām trīs hromatogrāfijas kolonnu *Waters Spherisorb*[®] 5 µm NH₂ 4,6x250 mm un *Waters XTerra MS C18* 3 µm, 2,1x150 mm, un *Phenomenex Synergi Hydro-RP* 4 µm, 2,0x150 mm kolonnu. salīdzinājumu, lai atrastu labāko. Par kustīgo fāzi izmantojām 0,1% skudrskābes šķīdumu ūdenī (kustīgā fāze A) un 0,1% skudrskābes šķīdumu acetnitrilā (kustīgā fāze B). Lunasīna standartšķīdumu ievadījām 20 µl tilpumā. Hromatogrāfisko analīzi veicām gradienta režīmā, kas parādīts 3.1.3. tabulā.

Gradianta programma

Laiks, min	Kustīga fāze A, %	Kustīga fāze B, %
0	90	10
20	10	90
25	10	90
30	90	10
35	90	10

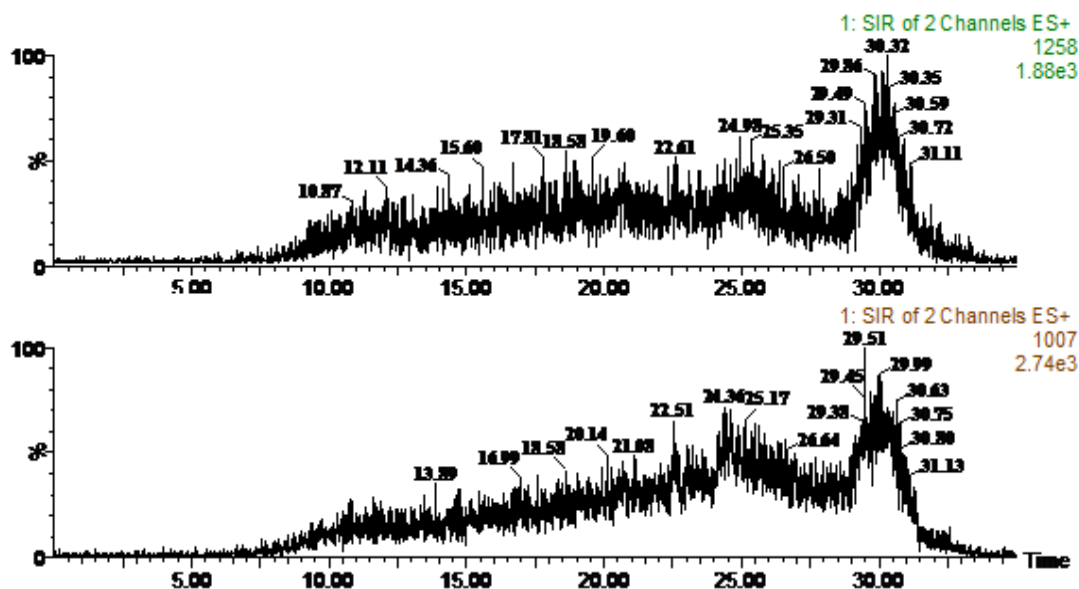
Izmantojot atšķirīgas kolonnas ieguvām lunasīna hromatogrammas (3.1.6. attēls).



3.1.6.attēls. Lunasīna hromatogramma, kas iegūta ar Waters Spherisorb® 5 µm NH₂ 4,6x250 mm kolonnu.

Rezultāti liecina, ka ar *Waters Spherisorb*[®] 5 μm NH_2 4,6x250 mm kolonnu netiek novērota laba sorbcija.

Izmantojot *Waters XTerra MS C18* 3 μm , 2,1x150 mm kolonnu, lietojām tādu pašu kustīgās fāzes un gradienta režīmu kā iepriekšējā eksperimentā (3.1.7.attēls).

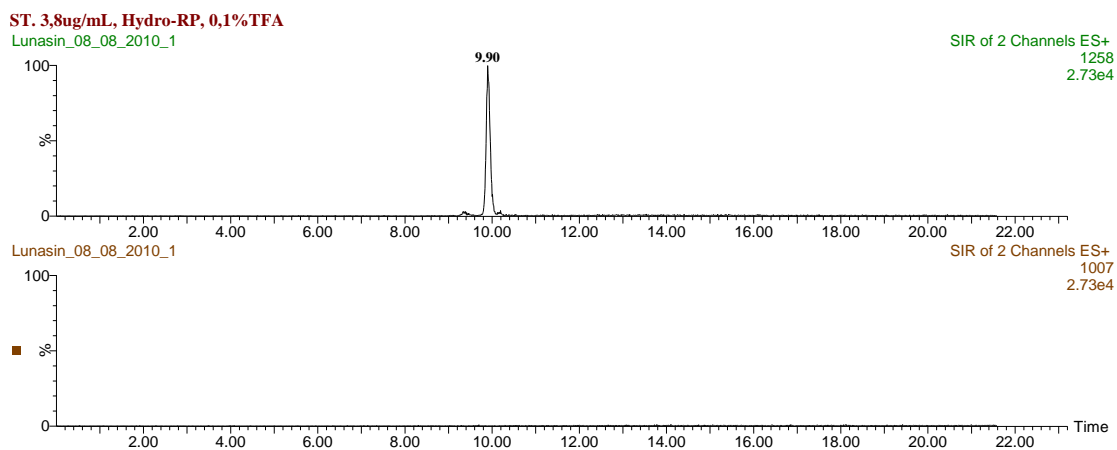


3.1.7.attēls. Lunasīna hromatogramma, kas iegūta ar *Waters XTerra MS C18* 3 μm , 2,1x150 mm kolonnu.

Novērojām labāku lunasīna sorbciju, bet joslu bija daudz un netika iegūta viena simetriska josla. No iegūtajiem rezultātiem secinājām, ka nepieciešams izmantot cita tipa hromatogrāfisko kolonnu, kuras sorbents ir piemērotāks hidrofilu (polāru) savienojumu analīzei. Tām ir ieteiktas arī citas kustīgās fāzes sastāvdaļas, kas spēcīgāk iedarbojas ar analizējamo vielu.

Izmantojot *Phenomenex Synergi Hydro-RP* 4 μm , 2,0x150 mm kolonnu kā kustīgo fāzi ņēmām 0,1% trifluoretiķskābes šķīdumu ūdenī (kustīgā fāze A) un 0,1% trifluoretiķskābes šķīdumu acetonitrilā. Trifluoretiķskābe darbojas gan kā buferviela, gan kā jonu pāru reaģents, kas var uzlabot hidrofilu savienojumu sorbciju apgrieztās fāzes hromatogrāfijā.

Šajā eksperimentā ievērojami uzlabojās hromatogrāfiskās joslas forma (3.1.8. attēls), bet nebija redzams jons ar m/z 1007.



3.1.8.attēls. Lunasīna hromatogramma, kas iegūta ar *Phenomenex Synergi Hydro-RP 4 μm, 2,0x150 mm* kolonnu.

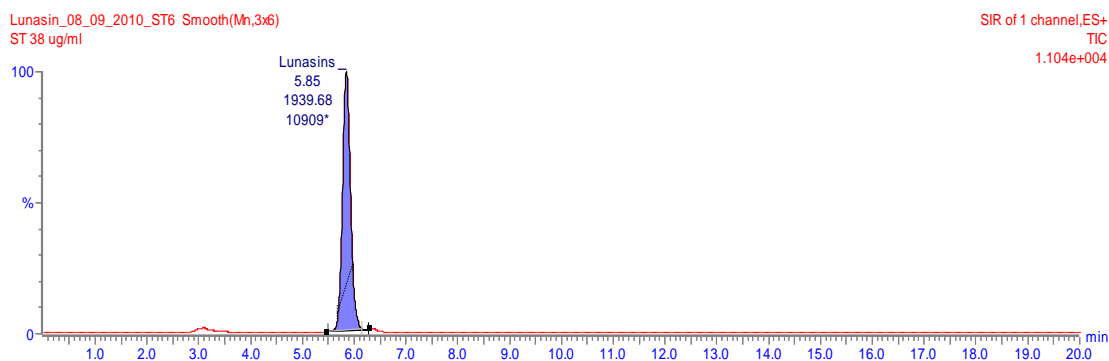
Tas ir skaidrojams ar trifluoretiķskābes ietekmi uz jonu veidošanos. Trifluoretiķskābe apspiež jonu veidošanos jonu avotā (*ion suppression*). Tomēr tā nebija ietekmējusi jona ar m/z 1258 veidošanos, kas ir kandidāts lunasīna identifikācijai.

Lai samazinātu analīzes laiku, mainījām gradienta programmu. Izmantotā gradienta programma parādīta 3.1.4. tabulā.

3.1.4.tabula

Gradienta programma

Laiks, min	Kustīgā fāze A, %	Kustīgā fāze B, %
0	80	20
8	40	60
11	40	60
12	80	20
20	80	20



3.1.9.attēls. Lunasīna hromatogramma, kas iegūta ar 3.1.4. tabulā aprakstīto gradienta programmu.

Optimizācijas rezultātā samazinājām lunasīna izdalīšanās laiku no 9,9 min uz 5,8 min un analīzes laiku par 15 minūtēm (3.1.9. attēls).

Balstoties uz veiktajiem eksperimentiem, izvēlējamies šķidrums hromatogrāfijas – masas spektrometrijas apstākļus, kuri parādīti sadaļā “Materiāli un metodes”.

Uzņemot meitas jonu spektru, tajā ir redzams meitas jons ar m/z 646,8640 (Da) signāls. Salīdzinot to ar datu bāzi, tika secināts, ka tas atbilst lunasīna fragmentam ar sekvenci KQLQGVNLTPEKH.

3.2. Miltu iesvara daudzuma izvērtēšana

Sākotnēji veicām eksperimentus, lai novērtētu minimālā iesvara lielumu lunasīna līmeņa mērīšanai. Analīzes veicām ar ekstraktiem no 3, 5 un 10 g miltu. Ekstrahēšana notika 0,1 M PBS buferī ar 0,1% proteāžu inhibitoru kokteiļa piedevu, ņemot miltus un buferi attiecībā 1:10.

Iegūtie rezultāti liecina, ka nav statistiski ticamu atšķirību lunasīna saturā, to ekstrahējot no dažāda iesvara paraugiem (tabula 3.2.1.).

Lunasīna līmenis dažāda iesvara miltu paraugos

N.p.k.	Miežu šķirne	Iesvars, g	Lunasīna saturs (µg/gmiltu)
1.	Idumeja	3	60, 3 ± 4,4
2.	Idumeja	3	63, 5 ± 2,2
3.	Idumeja	3	59, 4 ± 5,4
4.	Idumeja	5	60, 3 ± 6,3
5.	Idumeja	5	58, 9 ± 3,1
6.	Idumeja	5	60, 8 ± 2,7
7.	Idumeja	10	64, 3 ± 6,4
8.	Idumeja	10	60, 1 ± 1,9
9.	Idumeja	10	57, 8 ± 4,9

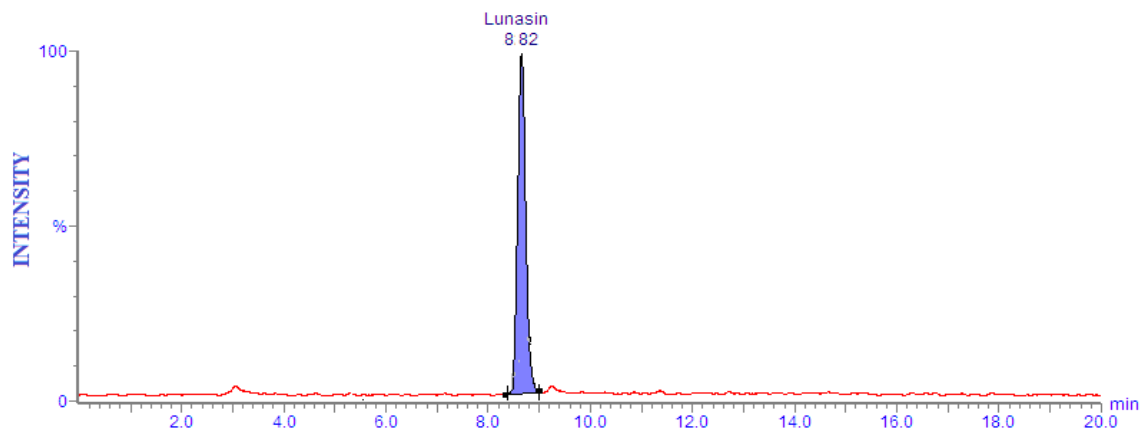
Dati parādīti kā vidējais ± standartnovirze (S.D.)

Analīzes veicām ar diviem paralēliem mērījumiem un eksperimentu atkārtojām trīs reizes.

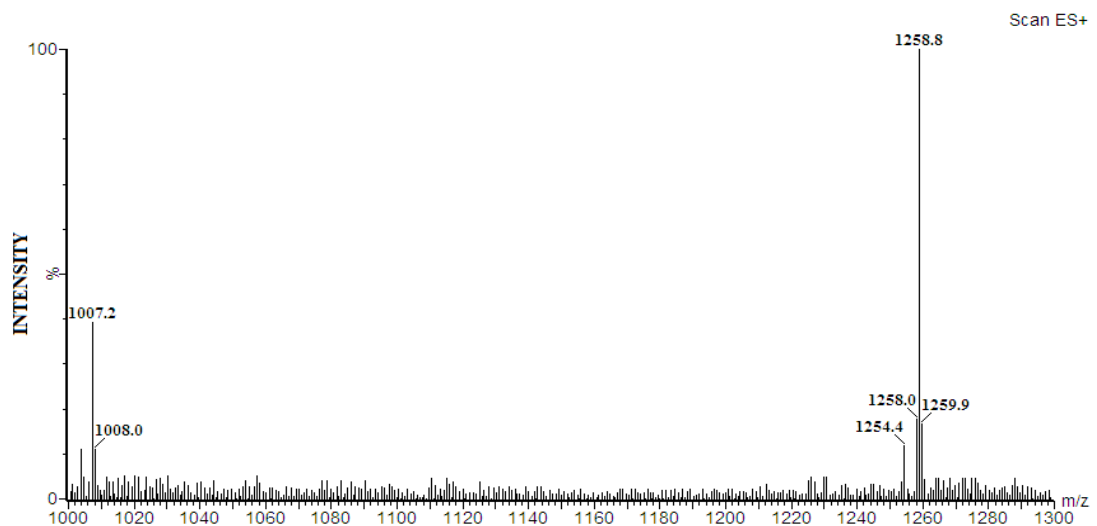
3.3. Lunasīna atklāšana tritikālē

Pētījumam izmantotās tritikāles šķirnes un līnijas saņēmām no Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta pētniekiem. Graudi tika samalti miltos un izsijāti.

Salīdzinot ar sintezētā lunasīna hromatogrammu, secinājām, ka no tritikāles izolētais peptīds ir lunasīns (attēli 3.3.1.; 3.3.2.).

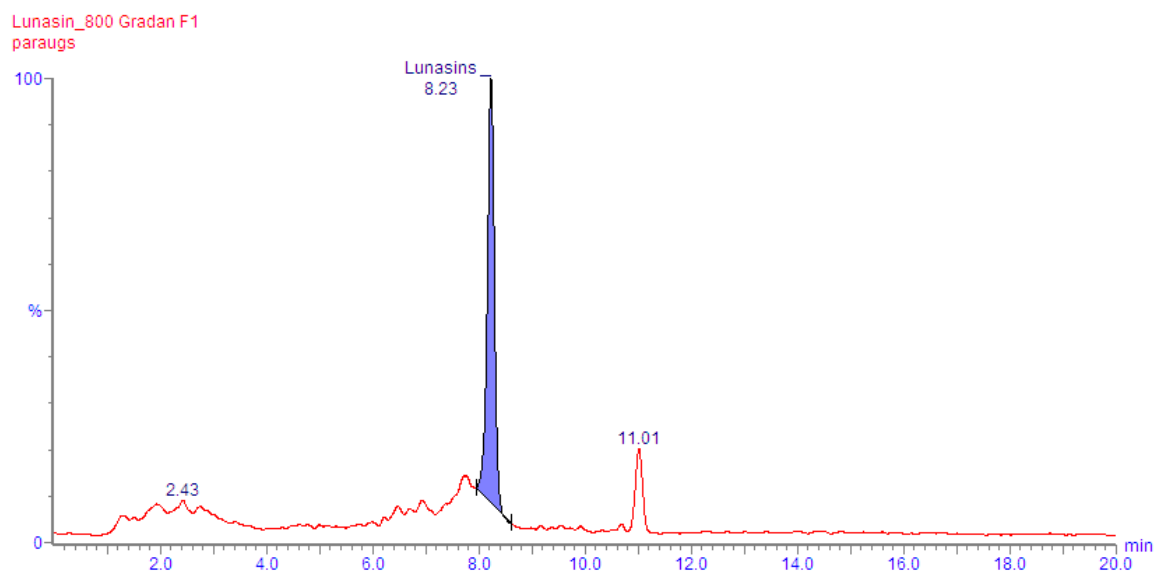


A



B

3.3.1.attēls. Sintezētā lunasīna hromatogramma (A) un masspektrs (B).



3.3.2.attēls. No tritikāles miltiem ekstrahēta lunasīna hromatogramma.

No tritikāles miltiem ekstrahēta lunasīna hromatogramma atbilst standarta hromatogrammai.

Lunasīna saturs tritikāles paraugos

Nr.	Paraugs	Lunasīns mg/g 2010. gada ražā	Lunasīns mg/g 2011. gada ražā	Lunasīns mg/g 2012. gada ražā
1	Dinaro	3,109 ± 20	2,160 ± 22	3,837 ± 88
2	9915-1-2 K	2,159 ± 72	2,959 ± 92	2,519 ± 92
3	0008-86 K	3, 123 ±74	3, 463 ±94	3, 203 ±94
4	9915-40 B	2,076 ±75	2,976 ±75	2,236 ±75
5	9933-109 B	2,835 ±90	3,135 ±90	3,105 ±90
6	ADM-4	1,666 ± 79	1,856 ± 72	1,456 ± 72
7	DSGU 10/94	1,324 ± 15	1,703 ± 84	1,504 ±98
8	0317-14	0,929 ± 12	1,384 ± 71	1,284 ± 100
9	0.002-26	6,458 ± 24	6,458 ±90	6,008 ±94
10	0213-22	1,984± 15	1,279 ± 44	1,179 ±90
11	0006-31	0,429 ± 10	0,529 ± 30	0,459 ± 40

Mērījumi veikti 3 paraugos un dati attēloti kā vidējais ± standartnovirze. Kodā burts K nozīmē audzēts konvencionālā veidā, burts B – bioloģiskā veidā. Bez K un B koda audzēti integrētā veidā.

Dinaro ir Polijā radīta tritikāles šķirne, DSGU 10/94 ir no Čehijas, bet pārējās šķirnes un līnijas ir radītas Latvijā. Stingri definētā lauksaimniecības sistēmā audzētu šķirņu un līniju gan ir par maz, lai spriestu par audzēšanas veida ietekmi.

Visas tritikāles šķirnes un līnijas satur lunasīnu, bet atšķirīgos daudzumos un secībā pēc augstākā līmeņa: 0.002-26 >Dinaro>0008-86 K> 9933-109 B>9915-40B >9915-1-2K>0213-22= ADM-4> DSGU 10/94>0213-22>0317-14>0006-31.

Lunasīnu ekstrahē ar PBS buferi 48-72 h, maisot miltus uz magnētiskā maisītāja 4 °C temperatūrā. PBS buferī pāriet ūdenī šķīstošie proteīni. Tāpēc, lai noskaidrotu, vai lunasīna saturs ir atkarīgs no ūdenī šķīstošo proteīnu daudzuma, izmērījām proteīna koncentrāciju tritikāles sešu šķirņu un līniju graudu ekstraktos (3.3.2. tabula).

3.3.2.tabula

Lunasīna un ar WST-8 metodi noteiktais proteīnu saturs tritikāles šķirnēs un līnijās

Nr.	Tritikāles šķirne/ līnija	Lunasīns µg/g miltu	Proteīna daudzums, mg/g
1	Dinaro	3109,22 ± 29,22	0,17±0,01
2	SGU 10/94	1324,39 ± 15,1	0,25±0,01
3	0317-14	929,77± 12,08	0,21±0,015
4	0002-26	6458,29 ± 24,02	0,28±0,02
5	0213-22	1984,33± 15,31	0,22±0,01
6	0006-31	429,97± 10,06	0,40± 0,02

Lunasīna satura mērījumu dati parādīti kā vidējais ± standartnovirze (S.D.), n=3

Tabulā redzams, ka ar lunasīnu visbagātākajai līnijai 0002-26 nav vislielākais proteīnu saturs. Visvairāk proteīnu ir līnijai 0006-31, kuram ir viszemākais lunasīna daudzums. Korelācija starp lunasīna saturu un ūdenī šķīstošo proteīnu daudzumu netika konstatēta.

Pārrēķinot lunasīna saturu uz proteīnu daudzumu, ieguvām ar dažām sojas šķirnēm salīdzināmu lunasīna daudzumu. Sojas proteīnā lunasīna koncentrācija bija 13–44 mg/g miltu, bet ar lunasīnu bagātos sojas miltos koncentrācijas sasniedza 27,3 mg/g miltu (de Mejia *et al.*, 2004).

Vidējais lunasīna saturs mg/g pret ūdenī šķīstošo proteīnu daudzumu

Nr.	Tritikāles šķirne/ līnija	Lunasīns mg/g miltu	Lunasīns mg/g proteīnu
1	Dinaro	3,109	18,288
2	SGU 10/94	1,32	6,28
3	0317-14	0,929	3,716
4	0002-26	6,458	29,09
5	0213-22	1,984	7,085
6	0006-31	0,429	1,0725

Lunasīna satura mērījumu dati parādīti kā vidējais (bez standartnovirzes), n=3

Iegūtie rezultāti liecina, ka, rēķinot lunasīna daudzumu uz proteīnu daudzumu, tritikāle ir ar lunasīnu bagāts graudaugs (3.3.3. tabula).

3.4. Lunasīna saturs rudzos

Eksperimentiem izmantojām četras Polijā radītas ziemas rudzu šķirnes un vienu Latvijas šķirni, tas ir, 'Gradan' F1, 'Walet', 'Amilo', 'Dankowki Diament'un 'Kaupo' (Latvija) (skat. 3.4.1. tabulu). Rudzu šķirnes audzētas konvencionālajā audzēšanas veidā, izmantojot standarta agronomijas praksi, kas ietver arī herbicīdu un minerālmēsļu pielietošanu.

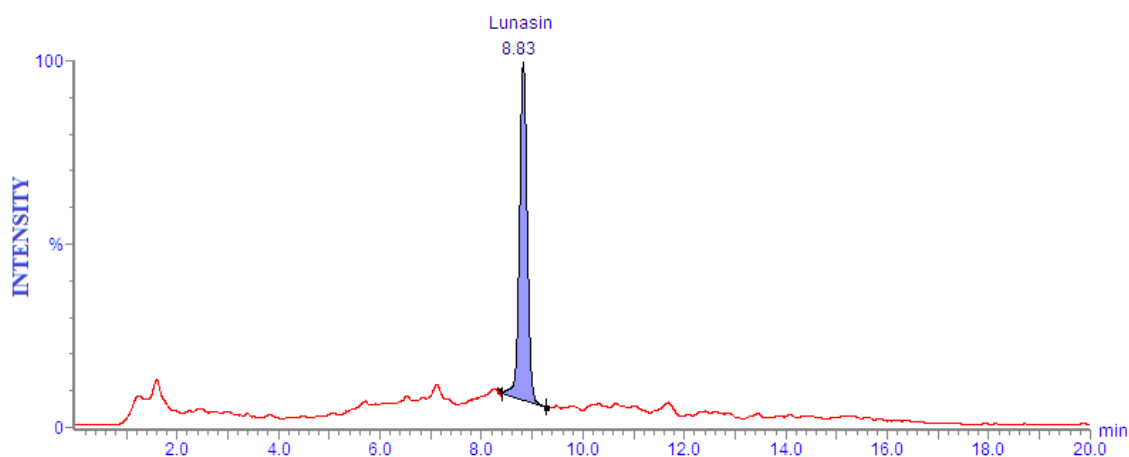
3.4.1.tabula

Lunasīna saturs rudzu šķirnēs 2011. un 2012. gadā

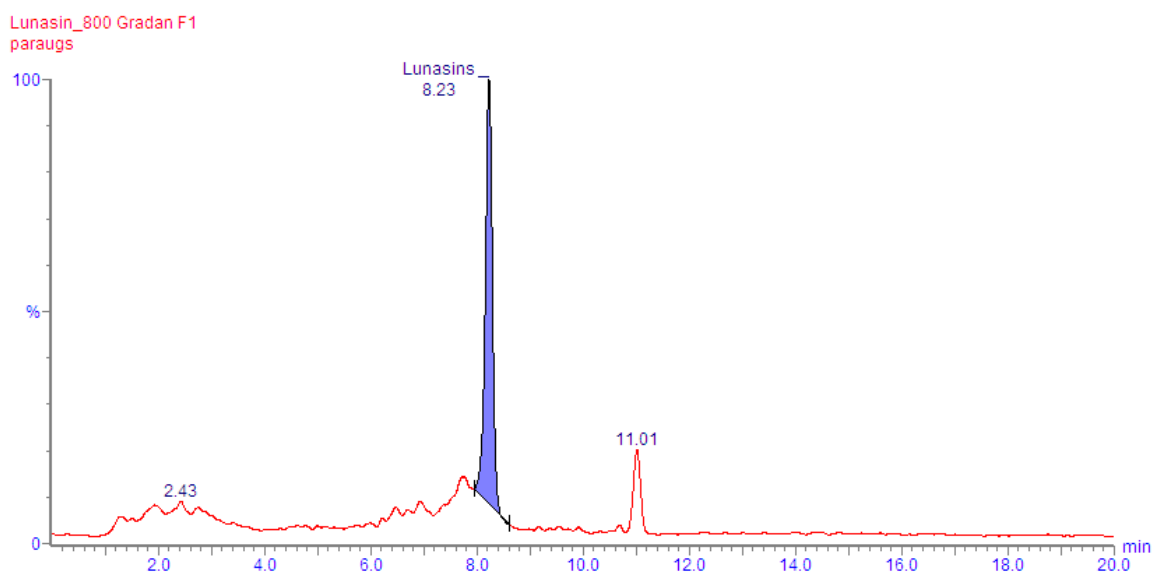
Nr.	Rudzu šķirne	Lunasīns µg/g miltu	
		2011.g.	2012.g.
1	Gradan fl	930,78 ± 19,22	1598,01 ± 102
2	Walet	871,16 ± 11,1	923,48 ± 30
3	Kaupo	1453,07 ± 13,06	1140,14 ± 54
4	Amilo	732,69 ± 14,02	1318,62 ± 48
5	D. Diament	1510,27± 15,21	1513,92 ± 52

Dati parādīti kā vidējā koncentrācija ar standartnovirzi, n=3.

Rezultāti liecina, ka lunasīna saturs divu gadu ražās ir atšķirīgs. Salīdzinot datus par lunasīna saturu augos abos ražas gados, var konstatēt, ka Grandan Fl, Walet un Amilo šķirnes augos 2012. gadā lunasīna saturs ir lielāks nekā iepriekšējā gadā, D. Diament šķirnes augiem tas praktiski nav mainījies, bet šķirnes Kaupo rudzos lunasīna saturs ir 2012. gada ražā ir mazāks nekā 2011. gada ražā.



3.4.1.attēls. Rudzu šķirnes „Kaupo” hromatogramma.



3.4.2.attēls. Rudzu šķirnes „Gradan” hromatogramma.

Visām rudzu šķirnēm lunasīna hromatogrammas parādīja labi izdalītu lunasīna smailli, un pēc sintētiskā lunasīna standartlīknes laukuma tika aprēķināta lunasīna koncentrācija rudzu paraugos. Lunasīna izdalīšanas laiks ir 8,2 min un ir iegūstama tipiska sekojoša hromatogramma (3.4.1. un 3.4.2. attēls).

3.5. Lunasīna saturs kviešos

Eksperimentiem izmantojām piecas ziemas kviešu šķirnes un līnijas, no kurām trīs ir selekcijas līnijas, bet šķirni „Fredis” izaudzējuši Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūta pētnieki; šķirne „Olivin” ir no Vācijas. Šīs ziemas kviešu šķirnes bija audzētas atbilstoši bioloģiskās lauksaimniecības sistēmai. „Fredis” un St.A-1 kvieši ir ieteikti kā pārtikas kvieši, bet līnija 99-115 — kā dzīvnieku barības šķirne. Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūta pētnieki noraksturoja graudu mitrumu.

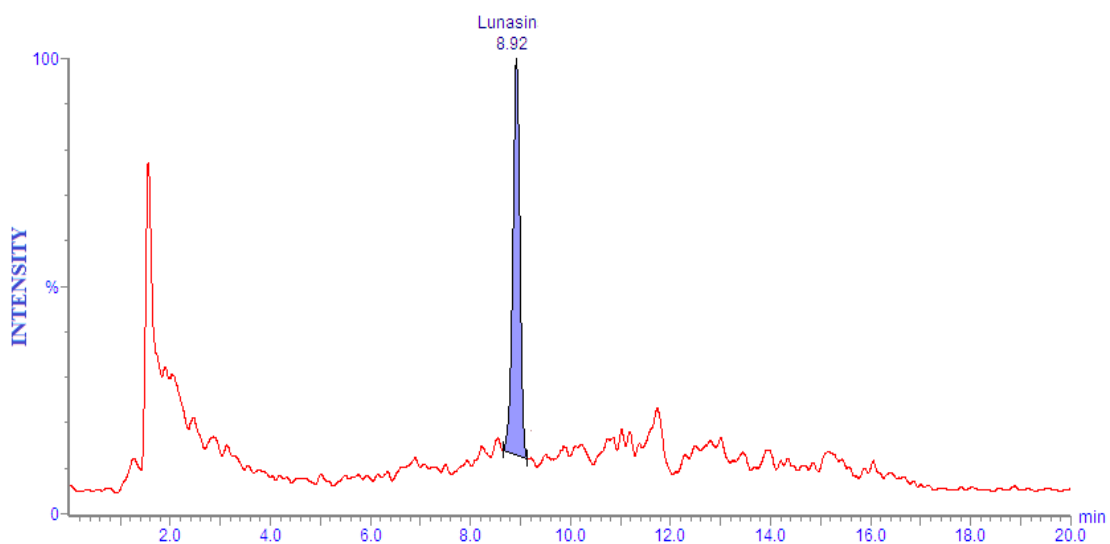
3.5.1.tabula

Lunasīna saturs ziemas kviešu šķirnēs un līnijās 2011. gada un 2012. gada ražās

Nr.	Paraugs	Lunasīns $\mu\text{g/g}$ miltu 2011.g.	Lunasīns $\mu\text{g/g}$ miltu 2012.g.	Mitrums, %
1	Ziemas kvieši „Fredis”	$233,87 \pm 10,12$	$45,13 \pm 5$	10,7
2	Z. kvieši 99-115	$12 \pm 1,1$	-	9,8
3	Z. kvieši 94-5	$10 \pm 1,02$	$62,32 \pm 3,1$	10,5
4	Z kvieši St.A-1	$200,30 \pm 14,22$	$28,1 \pm 1,2$	10,6
5	Z. kvieši „Olivin”	$190,33 \pm 12,21$	$10,96 \pm 1,1$	10,2

Dati parādīti kā vidējā koncentrācija ar standartnovirzi, n=3.

Iegūtie rezultāti (3.5.1. tabula) parādīja, ka kviešu paraugos ir neliels lunasīna daudzums, kas ievērojami variē starp ražas gadiem. 2012. gadā, salīdzinot ar 2011. gadu, tas būtiski samazinājies šķirnēm un līnijām Fredis, 99-115 (2012. g. nebija nosakāms), St.A-1 un Olivin. Vienīgi līnijai 94-5 novērojām lunasīna satura pieaugumu.



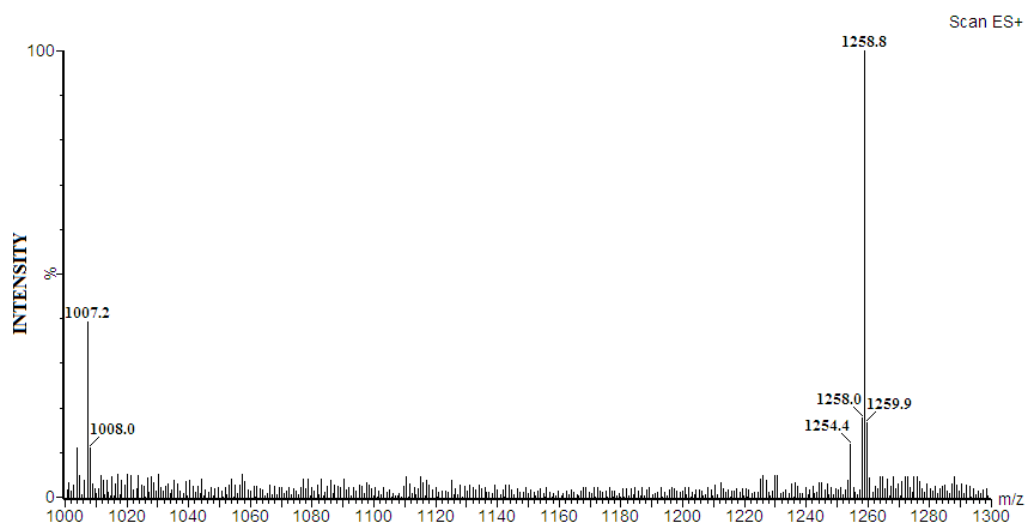
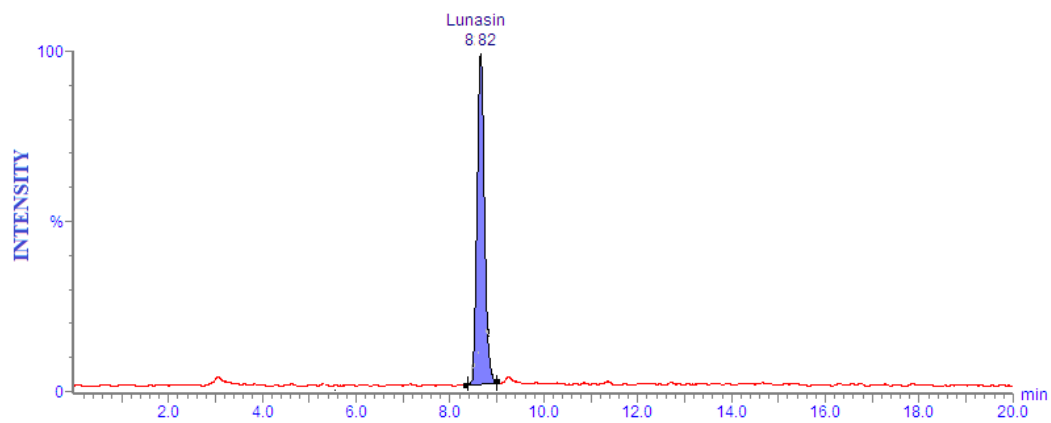
3.5.1.attēls. Ziemas kviešu šķirnes „Fredis” hromatogramma.

Visiem kviešu genotipiem lunasīna hromatogrammas parādīja labi izdalītu lunasīna smailli, un pēc sintētiskā lunasīna standartlīknes laukuma tika aprēķināta lunasīna koncentrācija kviešu paraugos.

3.6. Lunasīna izplatība auzu šķirnēs un līnijās

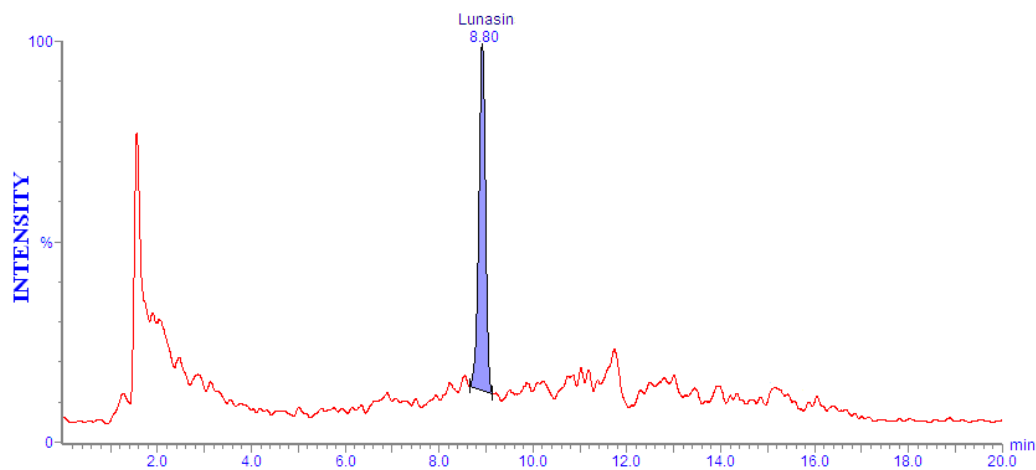
Pirms mūsu eksperimentiem nebija zināms, vai auzās ir atrodams lunasīns. Izvēlējamies eksperimentiem piecas atsēnalotas auzu šķirnes — “Laima”, ”Arta”, ”Stendes Līva”, “Ivory” (Vācija) — un selekcijas līniju S-156. “Laima” ir Latvijā vispopulārākā auzu šķirne, kurai auzu graudi nobriest vidēji vēlu, bet „Arta” ir agrā šķirne. „Stendes Līva” nobriest vēlu, bet ir labi piemērota graudu ieguvei. Vācijas šķirne „Ivory” ir labi adaptējusies Latvijas klimatā, bet selekcijas līnija S-156 ir ar izcilu graudu nokulšanas potenciālu. Auzu šķirnes un līnijas bija audzētas konvencionālā veidā. Graudu miltu ekstraktos lunasīnu eluējām 20 min laikā no katra parauga un ieguvām simetriskas smailes pēc 8,8 minūtēm.

3.6.1. attēlā parādīts hromatogrammas un masspektra piemērs sintētiskajam lunasīnam.



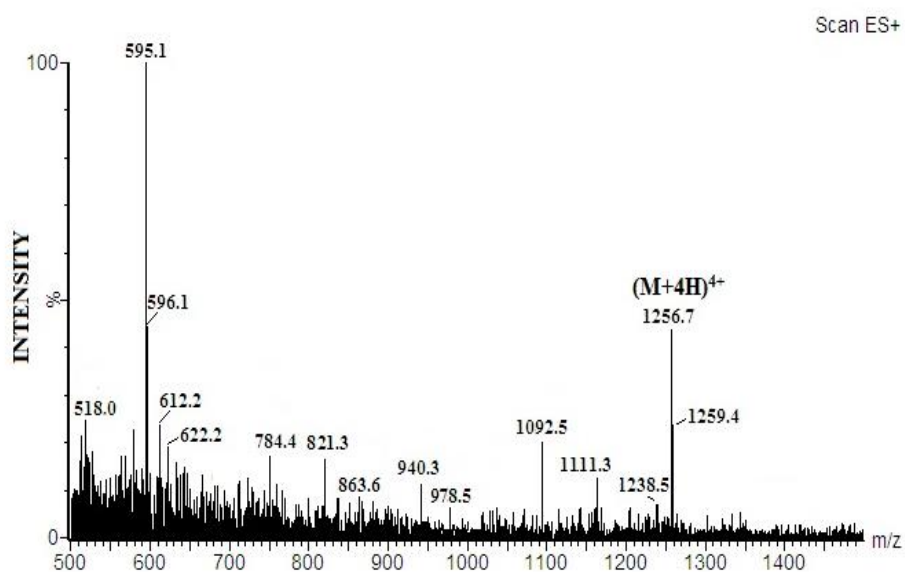
3.6.1. attēls. Sintētiskā lunasīna hromatogramma (augšējais attēls) un masspektrs (apakšējais attēls).

Visām auzu šķirnēm un līnijām atradām lunasīnam raksturīgas hromatogrammas, kas ir identiskas sintezētā lunasīna hromatogrammai.



3.6.2. attēls. Auzu līnijas S-156 hromatogramma.

ESI-MS/MS spektru analīze deva pierādījumus peptīda identitātei.



3.6.3.attēls. ESI-MS/MS spektrs no m/z 500 līdz m/z 1500.

m/z 1111.3 atbilst sekvencei GDDDDDDDDDD, bet m/z 595.1 — sekvencei PCEKH (3.6.3. attēls). Kvadrupola protonētais molekulas jons ar m/z 1258 tika noteikts ar viena jona pieraksta metodi (*single-ion recording* (SIR)). Izrēķinātie un salīdzinātie b un y joni apstiprināja lunasīna C gala sekvenci GDDDDDDDDDD. Lai aprēķinātu molekulāro jonu masas lādiņa attiecību un proteīna masu, tika izmantots brīvi pieejams tiešsaistes kalkulators (*Institute of*

Systems Biology). Jona $M+4H^{4+}$ (m/z 1256.7 reizināts ar 4) masa norāda uz peptīda masu apmēram 5026,8 Da, kas atbilst lunasīna masai.

Mēs mērījām lunasīna saturu divu gadu ražās un secinājām, ka lunasīns ir atrodams visos paraugos, bet koncentrācija ir ļoti mainīga: no 0,064 līdz 0,197 mg/g 2010. gadā un no 0,034 līdz 0,195 mg/g 2011. gadā. “Ivory” izrādījās ar lunasīnu visbagātākā auzu šķirne, tai seko “S-156” un ”Arta”. Lunasīna saturs “Ivory” šķirnē abos gados bija apmēram vienāds. Tomēr 2011. gadā mēs novērojām, ka lunasīna saturs ir samazinājies šķirnē “Laima” (58%) un “Stendes Līva” (apmēram par 13%), bet šķirnei “Arta” un līnijai “S-156” novērojām nelielu pieaugumu.

3.6.1. tabula

Lunasīna daudzums auzu šķirnēs un līnijās

Nr.	Šķirnes un līnijas	Lunasīns mg/g graudu	
		2010	2011
1.	Laima	0,081 ± 0,005	0,034± 0,002
2.	Arta	0,084 ± 0,003	0,117 ± 0,004
3.	Stendes Līva	0,064 ± 0,007	0,056 ± 0,003
4.	Ivory	0,197 ± 0,010	0,195 ± 0,009
5.	S-156	0,091 ± 0,005	0,117 ± 0,004

Dati parādīti kā vidējā vērtība ± SD, n = 3.

3.7. Audzēšanas veida ietekme uz lunasīna daudzumu miežos

Priekuļu Laukaugu selekcijas institūta laukos paralēli organiskajā un konvencionālajā veidā tika audzētas 22 pavasara miežu šķirnes un līnijas, kas atšķiras pēc morfoloģijas, izcelsmes un reģistrācijas statusa (šķirne vai selekcijas līnija); katra šķirne un līnija audzēta atsevišķi 6,5 m² lauciņos. Kopā analizējām 44 paraugus. Konvencionālajos lauciņos iepriekšējā gadā bija audzēti kartupeļi un izmantoti minerālmēsli, herbicīdi un insekticīdi, ko parasti lieto, audzējot kartupeļus. Organiskajos laukos iepriekšējā gadā bija audzēti zaļie zirnīši, lauki bija ravēti. Katra šķirnes un līnijas graudi pēc novākšanas tika izžāvēti līdz 14% mitruma līmenim. Lunasīna saturu mērījām divu gadu ražās (3.7.1. tabula).

Lunasīna saturs ($\mu\text{g/g}$) organiskā un konvencionālā veidā audzētās miežu šķirnēs un līnijās

Šķirne/ līnija	Organiskā sistēma					Konvencionālā sistēma					Vidējais eksp.
	2010	S.D.	2011	S.D.	vidējais	2010	S.D.	2011	S.D.	vidējais	
Idumeja	61,3	5,4	72,6	5,1	67,0	80,2	5,1	73,1	4,1	76,6 **	71,8 +
Rubiola	169,3	7,8	178,1	7,4	173,7 *	61,8	5,6	69,2	4,6	65,5 *	119,6 +
Abava	34,2	2,3	31,4	2,9	32,8	27,0	3,7	20,5	2,2	23,7	28,3
Rasa	5,0	0,4	8,0	0,7	6,5 **	7,0	0,5	10,0	0,3	8,5	7,5 -
Vienna	78,9	4,2	65,5	3,4	72,2 *	11,3	1,9	12,3	2,7	11,8 *	42,0
Annabell	84,1	3,3	79,8	3,6	82,0 *	18,7	1,7	22,9	3,1	20,8 *	51,4
Inari	5,0	0,3	5,1	0,4	5,1 **	8,0	0,4	5,0	0,3	6,5	5,8 -
PR-4814	30,9	3,6	36,0	2,8	33,4	14,4	2,1	10,7	1,9	12,5	23,0
PR-3605	12,0	1,4	13,3	1,9	12,7 **	10,0	0,4	9,2	0,9	9,6	11,1 -
PR-4812	23,8	1,8	16,7	1,5	20,3 **	3,5	0,8	6,6	0,4	5,0	12,6 -
PR-4825	47,0	4,7	54,5	2,3	50,7	12,8	2,5	20,8	1,6	16,8	33,8
PR-4407	99,8	5,7	139,0	1,1	119,4 *	18,2	3,2	15,6	0,9	16,9 *	68,2
PR-5145	86,3	5,5	166,0	4,3	126,2 *	13,4	2,9	19,4	0,9	16,4 *	71,3 +
PR-4181	68,9	4,3	80,6	2,2	74,8 *	11,9	2,7	16,2	0,4	14,1 *	44,4
PR-4121	151,3	6,8	156,0	2,2	153**	131,6	3,5	189,0	2,2	160,3 **	157,0 +
Primus	10,0	0,4	18,0	1,0	14,0 **	13,0	0,4	13,9	0,9	13,5	13,7 -
BZ12-83	9,9	2,7	11,3	0,6	10,6 **	10,0	0,9	14,6	0,8	12,3	11,5 -
Anni	17,3	2,2	19,5	1,0	18,4*	19,0	0,4	92,3	1,1	55,7 **	37,0
Dziugiai	108,6	6,6	95,4	1,0	102 **	82,0	2,5	168,0	2,5	125,2 **	113,6 +
BZ14-12	7,4	1,8	13,5	0,22	10,4 **	17,3	2,9	54,6	2,3	36,0	23,2

BZ14-99	13,6	2,3	23,7	1,3	18,7 **	9,1	2,2	12,4	0,9	10,8	14,7 -
Irbe	24,7	2,8	19,1	2,3	21,9 **	19,1	2,2	30,3	0,7	24,7	23,3
vidēji	52,2		59,2		55,7	27,3		40,3		33,8	44,8
min	5,0		5,1		5,1	3,5		5,0		5,0	5,8
max	169,3		178,1		173,7	131,6		189		160,3	157

* $p < 0,05$, vērtējot vidējo vērtību atšķirības konkrētajai šķirnei vai līnijai dažādās audzēšanas sistēmās

** $p < 0,05$, vērtējot vidējās vērtības virs vai zem šķirņu vai līniju vidējā līmeņa atbilstošajā audzēšanas sistēmā.

Atsevišķās miežu šķirnēs un līnijās lunasīna saturs svārstījās no 5,0 līdz 189,0 $\mu\text{g/g}$.

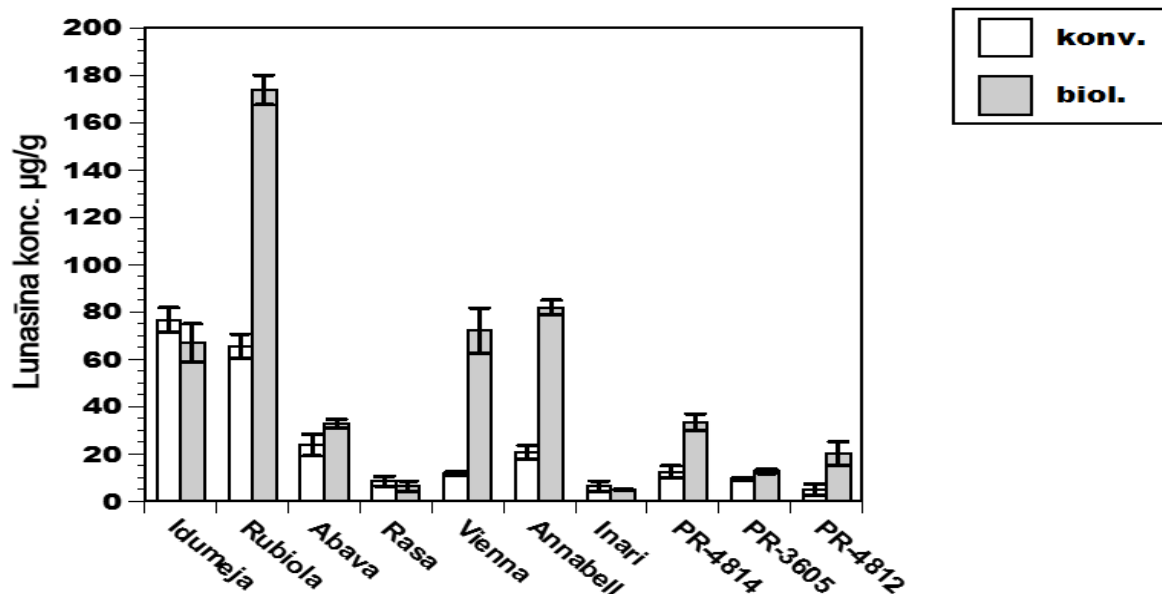
Šķirnes vai līnijas nozīme uz lunasīna saturu bija statistiski nozīmīga. Vidējais lunasīna saturs, ņemot vērā abus gadus un abas audzēšanas sistēmas, sešām šķirnēm un līnijām bija augstāks par vidējo, bet septiņiem — zemāks par visu šķirņu un līniju vidējo lunasīna saturu. Taču, salīdzinot lunasīna saturu atšķirīgu šķirņu un līniju augos tikai konvencionālajā audzēšanas sistēmā, trim šķirnēm un līnijām lunasīna saturs bija augstāks un nevienam no paraugiem tas nebija zemāks par vidējo līmeni. Atšķirīgi dati tika iegūti ar organiskajā veidā audzētajiem miežiem: šeit lielākam skaitam šķirņu un līniju lunasīna saturs bija augstāks nekā vidēji, lai gan šķirnēm “Rasa” un “Inari” visās analīzēs tika konstatēts zems lunasīna saturs (10 $\mu\text{g/g}$ vai mazāk).

Nozīmīguma faktori, kas ietekmē lunasīna saturu miežu graudos

Kvadrātu summu frakcionēšana, %					P vērtības			
Dati	Šķirne/ līnija	Audzēšana	Gads	Šķirnes / līnijas un audzēša nas mijieda rība	Šķirne/ līnija	Audzēšana	Gads	Šķirnes/ līnijas un audzēšana s mijiedarbī ba
2010	74,8	8,8			0,004	0,0029		
2011	69,8	3,2			0,018	n.s.		
Organiskā	96,1		0,5		<0,0001			
Konvenc.	88		2,4		<0,0001		0,028	
Kopumā	68,7	5,2		19,4	<0,0001	<0,0001		<0,0001

Ģenētiskā iedzimtība šķirnēm un līnijām sintezēt lunasīnu bija ļoti izteikta - 71,7%. Organiskajā audzēšanas veidā tās pašas miežu šķirnes producēja vidēji par 21,9 µg/g vai 64,8% vairāk nekā konvencionālajā sistēmā. Aprēķini liecina, ka audzēšanas veidam ir statistiski nozīmīga ietekme uz lunasīna saturu. Taču zīmīgi, ka 2011. gadā lunasīna satura atšķirība starp abiem audzēšanas veidiem bija 18,9 µg/g, un statistiskā ticamība nerasniedza $p \leq 0,05$ vērtību.

Sešām šķirnēm un līnijām organiskā audzēšanas veida gadījumā lunasīna saturs bija lielāks, bet ar šķirni "Anni" novērojam pretēju efektu. Šķirnei "Rubiola" abos gados un abās audzēšanas sistēmās lunasīna līmenis pārsniedza 100 µg/g. 3.7.1. attēlā salīdzināts lunasīna saturs dažu šķirņu un līniju augos atkarībā no audzēšanas sistēmas.

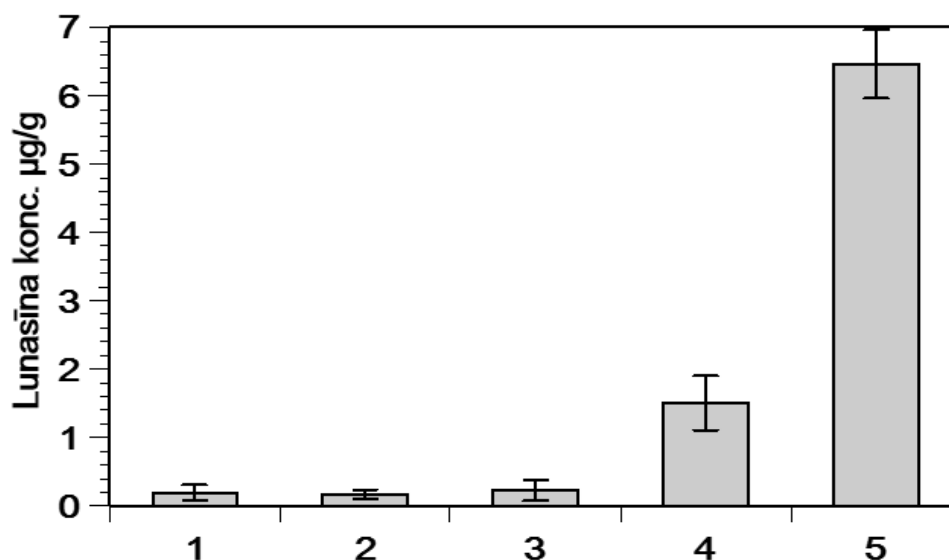


3.7.1. attēls. Lunasīna saturs bioloģiskajā un konvencionālajā sistēmā audzētās miežu šķirnēs un līnijās.

Organiskajā audzēšanas sistēmā šķirne, kas visvairāk producē lunasīnu, ir “Rubiola”, bet konvencionālajā sistēmā — līnija PR-4121, turklāt 2011. gadā šīs līnijas augos lunasīna saturs bija 189 µg/g arī organiskajā sistēmā. Šķirnei “Anni” lunasīna satura svārstības konvencionālajā sistēmā abos gados sasniedza svārstību koeficientu 93,1%. Statistiski nozīmīga bija šķirnes un audzēšanas sistēmas mijiedarbība. Augstākais vidējais lunasīna saturs abās audzēšanas sistēmās tika konstatēts 2011. gadā, taču statistiskā ticamība tika sasniegta tikai konvencionālajā sistēmā audzētajām šķirnēm un līnijām. Korelācija starp lunasīna saturu, gadiem un audzēšanas veidu bija ticama ($p < 0,01$). Korelācijas koeficients organiskajai sistēmai un gadam bija 0,94, bet konvencionālajai 0,90, un tas svārstījās no 0,44 līdz 0,69.

3.8. Lunasīna saturs salīdzinājums graudaugos

Mēs atradām lunasīnu tritikālē un auzās, kā arī izmērījām lunasīna daudzumu Latvijā audzētās rudzu un kviešu šķirnēs, kas atšķiras no literatūrā minētajām, jo ir ziemas šķirnes. Ja salīdzina visos graudaugos atrasto maksimālo un vidējo lunasīna daudzumu, redzams, ka visvairāk lunasīna satur tritikālē. Tomēr tritikāles šķirnēs un līnijās ir izteiktas atšķirības starp maksimālo un minimālo lunasīna daudzumu. Atrastais minimālais lunasīna daudzums tritikālē ir mazāks kā ziemas rudzu šķirnēs un līnijās.



3.8.1. attēls. Lunasīna saturs (µg/g) graudaugos: 1 — auzas, 2 — mieži, 3 — kvieši, 4 — rudzi un 5 — tritikāle.

Vērtējot vidējo lunasīna saturu, pētītie augi sarindojas šādā secībā: tritikāle > rudzi > kvieši = auzas > mieži. Miežu šķirņu un līniju pētījumos lielāks uzsvars tika likts uz audzēšanas veida novērtējumu nekā lunasīna izplatības noskaidrošanu. Tomēr miežiem tika izpētīts vislielākais šķirņu un līniju skaits, tāpēc par miežiem ir iegūts visvairāk datu.

3.9. Pētījumi par lunasīna producēšanos kartupeļos

Iepriekš veiktos pētījumos ir noskaidrots, ka lunasīns producējas nakteņu dzimtas (*Solanaceae*) augos. Tāpēc mēs pārbaudījām lunasīna producēšanos vairāku kartupeļu šķirņu un līniju sēklās un bumbuļos (3.9.1. tabula).

3.9.1. tabula

Lunasīna saturs kartupeļu bumbuļos

Nr.p.k.	Lauciņš	Šķirne, līnija	Lunasīna saturs
1.	Konvenciālais	“Prelma”	Netika atrasts
2.	Konvenciālais	“Imanta”	Netika atrasts
3.	Konvenciālais	S-01085-21	Netika atrasts
4.	Bioloģiskais	“Prelma”	Netika atrasts
5.	Bioloģiskais	“Imanta”	Netika atrasts
6.	Bioloģiskais	S 01085-21	Netika atrasts
7.	Bioloģiskais	“Gundega”	Netika atrasts
8.	Bioloģiskais	“Blue Congo”	Netika atrasts
9.	Bioloģiskais	“Laura”	Netika atrasts
10.	Bioloģiskais	“Monta”	Netika atrasts

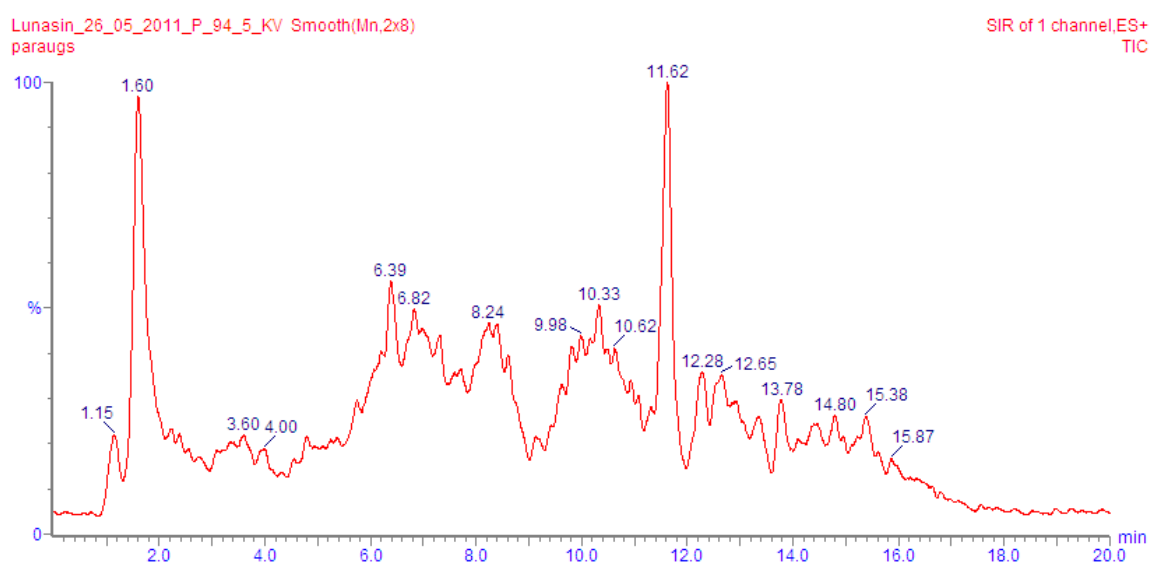
Neparādījās atšķirības starp bioloģiskajiem un konvencionālajiem laukiem, un nevienā paraugā neieraudzījām lunasīnam raksturīgu hromatogrammu un masspektru.

Lunasīns netika atrasts arī kartupeļu sēklās (3.9.2. tabula).

Lunasīna saturs kartupeļu sēklās

Nr.p.k.	Šķirne, līnija	Lunasīna saturs
1.	S02058-13	Netika atrasts
2.	S02085-5	Netika atrasts
3.	S02067-13	Netika atrasts
4.	S02125-57	Netika atrasts

Iegūtie rezultāti tika apstiprināti arī ar hromatogrāfijas metodi (3.9.1. attēls).

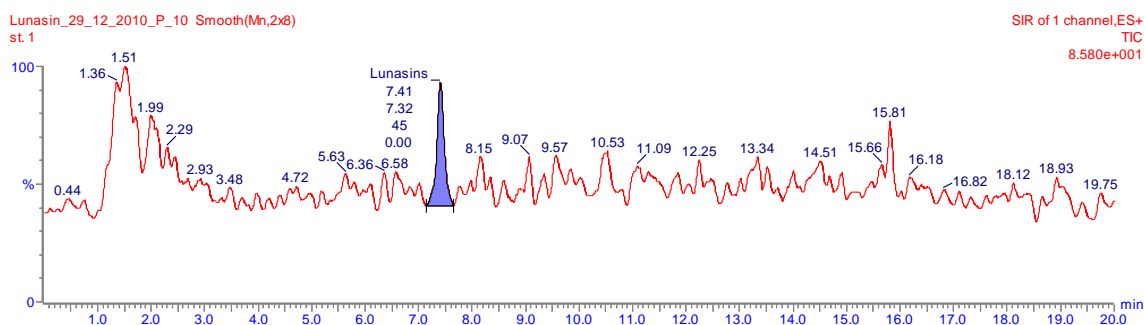


3.9.1. attēls. Kartupeļu sēklu ekstraktu hromatogramma

Hromatogrammā redzams matricas fons, bet nav lunasīnam raksturīga pīķa. Tādējādi secinājām, ka lunasīna kartupeļos nav.

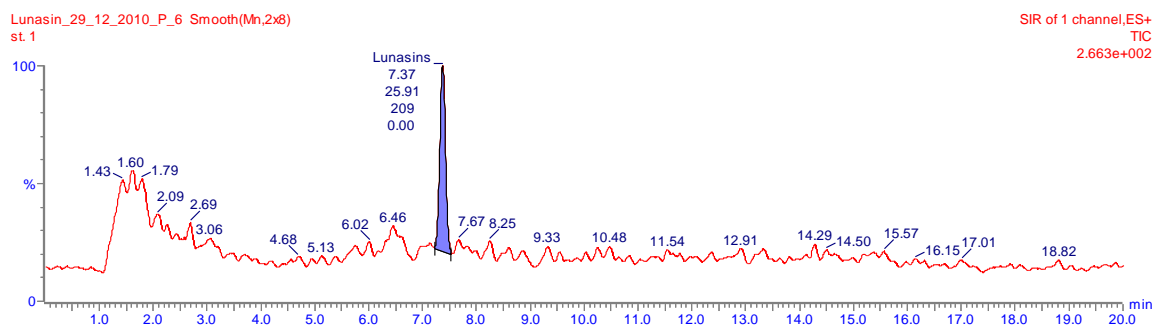
3.10. Lunasīna koncentrācija dzīvnieku barības granulās

Analizējot divus laboratorijas dzīvnieku barības granulu paraugus, ar to ekstraktiem ieguvām lunasīnam raksturīgās hromatogrammas.



3.10.1. attēls. Pārtikas granulu Nr. 30290 ekstraktu lunasīna hromatogrammas.

Lunasīns tika konstatēts paraugā nr. 30290. Ir redzams lunasīna pīķis, kas liecina par tā klātbūtni šajās barības granulās (3.10.1. attēls).



3.10.2. attēls. Barības granulu Nr. 29429 ekstraktu lunasīna hromatogrammas.

Lunasīns tika konstatēts arī paraugā nr. 29429 (3.10.2. attēls). Aprēķinot lunasīna koncentrāciju barības granulās pēc sintētiskā lunasīna standartlīknes, konstatējām atšķirīgus lunasīna daudzumus. Sērija 29429 saturēja 3,5 reizes vairāk lunasīna nekā sērija 30290 (3.10.1. tabula).

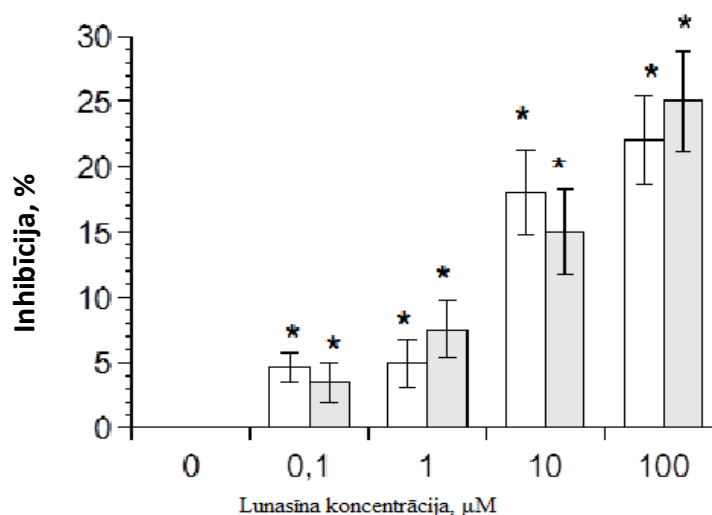
Lunasīna saturs laboratorijas dzīvnieku barības granulās

Nr.p.k.	Sērijas numurs	Lunasīna saturs
1.	30290	0,0206 ± 0,001 mg/g
2.	29429	0,0719 ± 0,001 mg/g

Dati parādīti kā vidējais ar standartnovirzi, n=3.

3.11. No auzām ekstrahētā un sintētiskā lunasīna antioksidanta aktivitāte

Antioksidanta aktivitātes noteikšanai izvēlējamies izmantot DPPH koncentrācijas samazināšanas metodi, ar kuru nosaka vielas spēju samazināt šī brīvā radikāļa koncentrāciju, kas liecina par antioksidanta darbību. Lunasīna antioksidanta efektu vērtējam pēc tā spējas 0,1; 1; 10 un 100 μM koncentrācijā samazināt stabilā brīvā radikāļa DPPH līmeni. Par kontroli izmantojam DPPH šķīdumu bez inhibitora (lunasīna) klātbūtnes, un tāpēc pieņemām, ka DPPH koncentrācija ir maksimālā iespējamā, bet inhibīcija — nulle. Rezultāti atspoguļoti 3.11.1. attēlā.

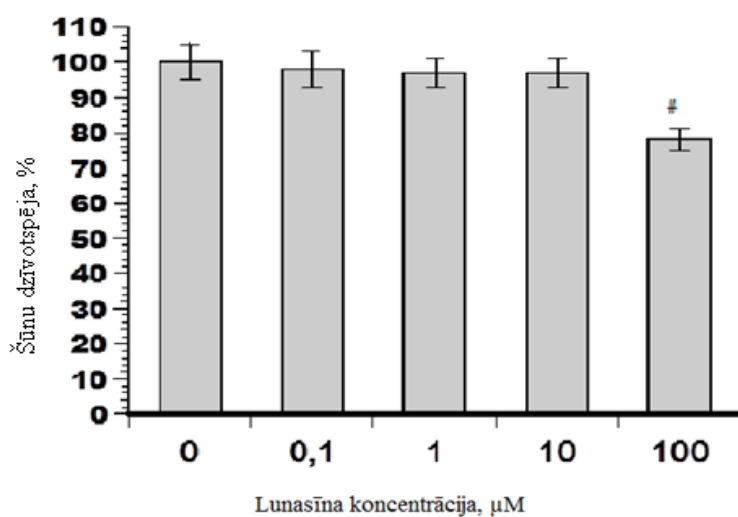


3.11.1. attēls. Sintētiskā lunasīna (baltie stabiņi) un no auzām izolētā peptīda (pelēkie stabiņi) DPPH koncentrāciju inhibējošie efekti, * $p \leq 0,05$ vs. kontrole (DPPH šķīdums).

3.11.1. attēlā redzams, ka abu peptīdu efekti neatšķiras, un gan sintētiskais, gan no auzām izdalītais lunasīns šajā testā uzrāda antioksidanta īpašības.

3.12. Lunasīna efekts uz šūnu proliferāciju

Ir zināms, ka lunasīnam, galvenokārt, ir citotoksiska iedarbība uz vēža šūnu līnijām, tomēr iespējams, ka lielākā koncentrācijā šis peptīds varētu samazināt arī citu šūnu līniju dzīvotspēju. Lai noskaidrotu lunasīna ietekmi uz šūnu dzīvotspēju, izmantojām cilvēka embrija nieru šūnu līniju HEK293, kas ir viena no eksperimentos plaši izmantotām šūnu līnijām. Iegūtie rezultāti liecina, ka šo šūnu dzīvotspēju lunasīns ietekmē tikai 100 μ M koncentrācijā, to samazinot. (skatīt 3.12.1. attēlu).



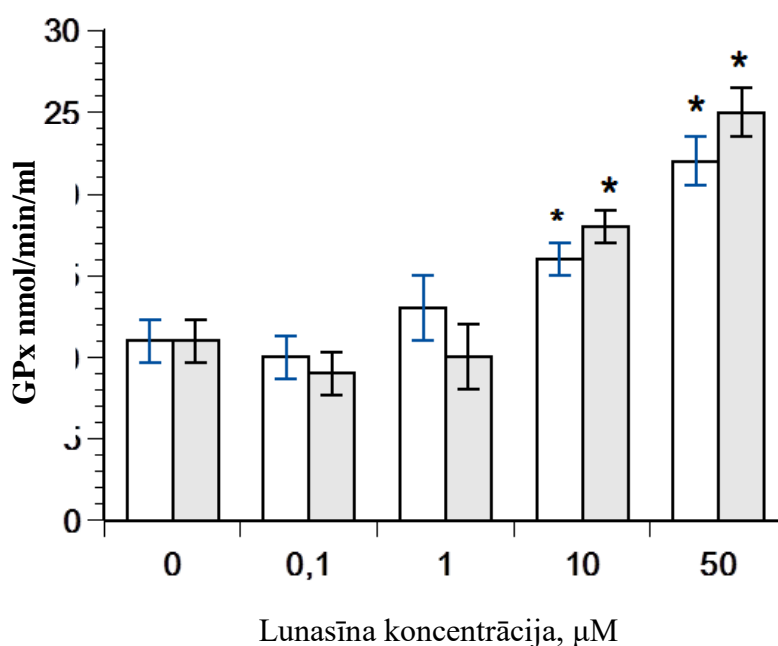
3.12.1. attēls. Lunasīna ietekme uz HEK293 šūnu dzīvotspēju.

$p \leq 0,05$ vs. kontrole bez lunasīna.

Rezultāti rāda, ka lunasīns nav toksisks normālām cilvēka šūnām, jo dzīvotspējīgo šūnu skaits par 20% samazinās tikai tad, ja lunasīna koncentrācija ir tik liela kā 100 μ M.

3.13. Lunasīna efekts uz glutationperoksidāzes aktivitāti

Glutationperoksidāzes aktivitātes pieaugums parāda peptīda antioksidanta darbību, jo šis enzīms ir viens no enzīmiem, kas regulē peroksīdu līmeni šūnās. Sākot no 10 μM koncentrācijas, lunasīns paaugstināja glutationperoksidāzes aktivitāti, un nekonstatējām atšķirības starp sintētiskā un no auzām izolētā lunasīna efektiem. Rezultāti grafiski attēloti 3.13.1. attēlā.



3.13.1.attēls. Sintētiskā lunasīna (baltie stabiņi) un no auzām izdalītā peptīda (pelēkie stabiņi) ietekme uz glutationperoksidāzes (GPx) aktivitāti HEK293 šūnu līnijā.

* $P \leq 0,05$ vs. kontrole bez lunasīna.

Zinot lunasīna citotoksisko darbību 100 μM koncentrācijā, kā augstāko koncentrāciju šajā eksperimentā izvēlējāmies 50 μM , lai neietekmētu šūnu skaitu paraugos, kuriem pievienots lunasīns.

4. DISKUSIJA

4.1. Lunasīna kvantitatīvās noteikšanas metožu attīstība

Pēc lunasīna atklāšanas sojā sākās intensīva metožu izstrādāšana, lai varētu kvantitatīvi izmērīt lunasīna daudzumu. De Mejia ar līdzautoriem (2004) izstrādāja ELISA metodi, bet, lai to paveiktu, vispirms bija jāiegūst antivielas pret lunasīnu. Tika iegūtas monoklonālās antivielas pelē un poliklonālās antivielas trušī, un kā sekundārās antivielas izmantoja ar sārmaino peroksidāzi konjugētas anti-peles IgG vai anti-truša IgG antivielas. Lunasīna monoklonālās un poliklonālās antivielas ieguva pret epitopiem EKHIMEKIQGRGDDDDDD un CEKHIMEKIQGRGDDDDDD. Kā redzams, izmantota lunasīna īpatnējā C gala sekvenca, kurai, kā izrādās, ir arī labas antigēna īpašības. Truša poliklonālās antivielas tika izmantotas atšķaidījumā 1:250, bet monoklonālās — atšķaidījumā 1:1000, un lunasīna koncentrācijas noteikšanas līknes lineārais posms bija no 8 vai 16 līdz 48 ng/ml (Dia *et al.*, 2013). Koncentrācijas un absorbācijas blīvuma pieauguma linearitāte ir samērā zema, un ar šo metodi nevar izmērīt zemas un augstas lunasīna koncentrācijas. Lineārais posms ir tik mazs, ka būtu grūti eksperimentos atrast pareizo atšķaidījumu.

ELISA metodes autori ieteica lunasīna attīrīšanai izmantot jonu apmaiņas mikrospinkolonnas un tad mērīt lunasīna koncentrāciju plazmā. Iespējams, ka mērījumiem cilvēku vai dzīvnieku asins plazmā ELISA metodes būtu piemērotas, jo tās ir klīnikā ierastas rutīnas metodes un neprasa dārgu aparātūru. Pētnieki uzsver, ka no augiem izolētā peptīda spēja saistīties ar antivielām norāda uz saglabātu sekundāro struktūru, tātad arī uz biopieejamību. Sākotnēji lunasīna atklāšanai un satura noteikšanai izmantoja imunoloģiskās metodes, kas pamatojas tikai uz lunasīna fragmenta/antigēna atklāšanu. Tomēr, ja cits peptīds būtu līdzīgs lunasīnam un atšķirtos tikai ar vienu aminoskābi, to nevarētu atklāt ne ELISA, ne vesternblota testos. Autori ar ELISA metodi ieguva lineāru standartlīkni no 8 līdz 48 ng/ml, kas ļāva izmērīt lunasīna saturu sojas šķirnēs un līnijās, un vesternblota analizē pierādīt peptīda identitāti. Nenoliedzami ELISA metodi var izmantot un izmanto arī mūsdienās. Līdz šim gan nav publicēti dati, ka būtu uzlabota linearitāte.

Imunometodēm piemīt augsta jutība, bet trūkst nepieciešamās selektivitātes, lai noteiktu atšķirību starp pirmējiem peptīdiem un to attiecīgajiem metabolītiem. Ne vienmēr ar antivielām var uztvert metabolisma inducētāju ierosinātās peptīda molekulas izmaiņas (piem., N-vai C-gala nošķelšanu), un šis tests uzrāda pārrobežu aktivitāti (*cross-reactions*), jo antivielas saistās ar radniecīgiem peptīdiem, kuriem ir līdzīgs antigēna rajons (Tamvakopoulos, 2007; Murao *et*

al., 2007; Xi *et al.*, 2012). Ar ELISA metodi nebija iespējams mērīt lunasīna koncentrāciju plašā diapazonā, un metožu izstrādāšana turpinājās. Tika izmēģināta jonu apmaiņas hromatogrāfija, daļiņu lielumu izslēdzošā hromatogrāfija ar ultrafiltrēšanu, ELISA varianti, westernblots, augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija (AEŠH jeb HPLC) ar diožu rindas detektoru un matricas asistētā lāzera desorbcijas/ionizācijas lidojuma laika (MALDI-TOF) peptīda masas noteikšanas metode (Dia *et al.*, 2009). Tika izmēģināta arī AEŠH masspektrometrijas/masspektrometrijas tandēma metode (Dia *et al.*, 2009). Bet, atšķirībā no mūsu pieejas, literatūrā aprakstītajā metodē analizēja vispirms ar tripsīnu sašķelta peptīda fragmentus. Jeong *et al.* (2007) izmantoja šķidrums hromatogrāfijas elektroizsmidzināšanas masspektrometrijas metodi (ŠH-ESI-MS), lai izmērītu lunasīna daudzumu no kviešiem iegūtos ekstraktos. Lunasīna peptīdu identificēja pēc fragmenta KQLQGVNLTPEKH ar molmasu 656,8640 Da. No rudziem izolēto lunasīnu identificēja un tā daudzumu izmērīja ar AEŠH-UV detektora metodi (Jeong *et al.*, 2009). Analizējot 21 rudzu šķirni un līniju, sešās lunasīns netika atrasts, kas liecina par iespējamām lielām lunasīna satura svārstībām un nepieciešamību pēc metodēm, ar kurām iespējams mērīt dažādus lunasīna daudzumus.

MS lietošana peptīdu identificēšanai ļauj pārvarēt galvenos imunoloģisko metožu trūkumus, bet katram peptīdam ir nepieciešama atsevišķa analīze (Hook *et al.*, 2010; Xi *et al.*, 2012). MS spēj sniegt pilnīgu informāciju par strukturālo specifiku, tādējādi neļaujot notikt interferencei, un vienas analīzes laikā var vienlaicīgi identificēt vairākus peptīdus (Tamvakopoulos, 2007; Xi *et al.*, 2012). Tomēr praksē novēro, ka imunoloģiskās metodes peptīdu un proteīnu daudzuma noteikšanā tiek izmantotas daudz plašāk, jo ir komerciāli pieejami reaģentu komplekti (kiti), un masspektrometrijas potenciāls farmakoloģiski aktīvu peptīdu pētniecībā nav pilnīgi izmantots (Tamvakopoulos, 2007; Xi *et al.*, 2012). Mēs šajā darbā lunasīna identificēšanai un noteikšanai izmantojām šķidrums hromatogrāfijas un masas spektrometrijas tandēma metodi (ŠH-MS/MS). Turklāt mēs pirmie ieviesām cietfāzes ekstrakciju lunasīna attīrīšanai un atdalīšanai no traucējošiem savienojumiem (Nakurte *et al.*, 2012), kas ļāva atteikties no ultracentrifugēšanas, jonu apmaiņas un citām pirmapstrādes attīrīšanas metodēm. Lai veiksmīgi varētu izmantot masspektrometru ar mērīšanas diapazonu līdz 2000 Da, elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā ieguvām molekulāros jonus ar vairākiem lādiņiem, tādējādi samazinot m/z vērtību un izvairoties no vajadzības vispirms sašķelt peptīdu ar tripsīnu līdz fragmentiem. Mēs veicām lunasīna satura mērīšanas metožu salīdzinājumu un noskaidrojām, ka pilns lunasīna UV absorbcijas spektrs ir robežās no 190 līdz

600 nm. Tomēr UV detektora lietošana nenodrošina labu kvantitatīvo analīzi, un mēs no tā atteicāmies.

Progress šķidrums hromatogrāfijas un masas spektrometrijas tehnoloģiju attīstībā piedāvā lieliskas iespējas bioaktīvo peptīdu noteikšanai (Guijarro-Diez *et al.*, 2014). Augstas izšķirtspējas masspektrometrijas izmantošana ļāva apzināties nepieciešamību pēc jaunas metodes, ar kuru varētu ticami identificēt un noteikt lunasīnu. Zinātniskajā literatūrā aprakstītas dažādas pieejas izcelsmes signāla slāpēšanai, matricu atšķaidīšanai, iepriekšējai lunasīna frakcijas attīrīšanai, apgrieztās fāzes vai jonu apmaiņas cietās fāzes ekstrakcijai un dažādu hromatogrāfijas kolonnu izmantošanai ar mērķi samazināt interferenci. Apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfija ļāva ievērojami samazināt matricas interferenci. Matricas traucējumi ir saistīti ar endogēniem, sugai raksturīgiem piemaisījumiem, kas joprojām pastāv pēc pirmapstrādes vai ekstrakcijas. Šie traucējumi var izraisīt jonu slāpēšanas parādību analīta pilienu veidošanās (vai iztvaikošanas) efektivitātes izmaiņu dēļ un nosaka, cik liels skaits analizējamo vielu jonu sasniedz detektoru (Annesley, 2003).

Parasti potenciāli jonu slāpētāji ir gaistošie savienojumi vai metabolīti ar līdzīgu ķīmisko uzbūvi, kas eluējas līdzīgi analizējamai mērķa vielai. Patiešām, noteikti jonu veidi (neorganiskie elektrolīti, sāļi), polārie savienojumi (fenoli, arilsulfonāti), kā arī organiskas molekulas (ogļhidrāti, amīni, urīnviela, lipīdi, peptīdi) var būtiski ietekmēt metodes selektivitāti, atkārtotamību, precizitāti, reakcijas linearitāti (signāls *vs.* koncentrācija) un kvantitatīvās noteikšanas robežu (Annesley, 2003; Gosetti *et al.*, 2010). Jaunu, gultai līdzīgu kolonnu iepakojumu tehnoloģiju (piemēram, *fused-core*®) attīstība ir pavērusi jaunas iespējas, lai pārvarētu šo problēmu. Sakausētas serdes daļiņas sastāv no cieta kodola 1,7 μm izmērā, ko ieskauj neliela poraina čaula 0,5 μm izmērā. Salīdzinot ar pilnīgi porainām daļiņām, kausētas serdes daļiņas paātrina hromatogrāfisko sadalījumu un palielina efektivitāti, jo saīsina difūzijas ceļus, kas samazina masu pārsūtīšanas pretestību un samazina maksimālo hromatogrāfijas pīķu paplašināšanu. Pētījumi pierādīja, ka kausētas serdes kolonnas priekšrocības ir tādas, ka neprasa īpašus instrumentus un ir mazāk uzņēmīgas pret sastrēgumiem, jo ir lielāks ieplūdes porainā materiāla izmērs. Tomēr, neskatoties uz šo tehnoloģisko attīstību, ir daudzi gadījumi, kad arī šīs tehnoloģijas neļauj atklāt vēlamo bioloģiski aktīvo peptīdu, jo traucējumus izraisījusi signāla apspiešana (Ruta *et al.*, 2010). Pēc ŠH/MS/MS metodes optimizācijas un selektivitātes, linearitātes, precizitātes un kvantitatīvās noteikšanas robežu apstiprināšanas bija iespējams izmērīt arī nelielu lunasīna saturu sojā — 25 ng /ml (1,5 μg lunasīna/g proteīnu). No sojas miltiem izolēta lunasīna koncentrācija svārstījās no 14,0 līdz 22,5 mg lunasīna/g proteīnu

(Guijarro-Diez *et al.*, 2014). Citi autori, piemēram, *Guijarro-Diez et al.* (2014) atzinīgi vērtē mūsu izstrādāto metodi ar tādiem jauninājumiem kā cietfāzes ekstrakciju, reversās fāzes kolonnas un zemas masspektrometrijas analīzi, ko aprakstījām savā publikācijā (Nakurte *et al.*, 2012).

Ir publicēti lunasīna šķīdumu stabilitātes pētījumi, un tajos secināts, ka istabas temperatūrā šķīdumi ir stabili 12 h, ledusskapja temperatūrā — vairāk nekā 24 h, bet, uzglabājot saldētavā $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā, visā pētījuma laikā nekonstatēja koncentrācijas samazināšanos. Istabas temperatūrā pēc 12 h novēroja peptīda pielipšanu pie mēģenes sienīnām, bet ne struktūras sabrukumu (Guijarro-Diez *et al.*, 2014).

Šķidrums hromatogrāfijas-masspektrometrijas metodi arvien vairāk iesaka izmantot bioloģisku vielu testēšanai (Aubry, 2011). Tomēr arī tā nav bez trūkumiem, un pētnieki jau strādā pie citas — mikroplūsmas šķidrums hromatogrāfijas-masspektrometrijas — metodes (MFLC), kas samazinātu matricas ietekmi uz mērījumiem un prasītu mazāku mobilās fāzes šķīdinātāju patēriņu (Steuer *et al.*, 2015).

Jonizācijai ar elektroizsmidzināšanu (ESI) paraugā esošiem peptīdiem un proteīniem pievieno vienu vai vairākus lādiņus aminoskābju N-galā atkarībā no to bāziskuma pakāpes. Peptīdiem piešķirtais lādiņa lielums variē atkarībā no tādiem faktoriem kā jonizējamo grupu skaits, proteīna struktūras īpašības (pirmējā vai telpiskā struktūra), izmantotā šķīdinātāja īpašības (šķīdinātāja polaritāte, pH vērtība, piemaisījumu klātbūtne), kā arī no jonizācijas avota un iespējamās daļiņu mijiedarbības masas analizatorā. Uzņemtajā masas spektrā peptīdi tipiski tiek novēroti, ja to lādiņa lielums ir no diviem līdz pieciem protoniem $[(M+2H)2+$ līdz $(M+5H)5+]$ un masas/jona lādiņa lieluma attiecība ir starp 300 un 1500 m/z (Soares *et al.*, 2012). Proteīnu šķelšanai tiek izmantots enzīms tripsīns, kas katalizē peptīdsaišu hidrolīzi aiz katra Lys un Arg gandrīz visos proteīnos (Soares *et al.*, 2012).

4.2. Lunasīna līmeņa svārstības augos

Lai varētu salīdzināt lunasīna daudzumu dažādos augos, to pieņemts izteikt masas vienībās uz sēklu vai proteīnu daudzumu. Dažos augos, piemēram, piparu sēklās, ir ļoti maz lunasīna (Kwon *et al.*, 2005), un līdz šim noskaidrotais augu izcelsmes produkts ar visbagātāko lunasīna saturu ir sojas pupiņas. Lunasīna proproteīnu sojā kodē Gm2S-1 gēns, un sojas pētnieki ir pārliecināti, ka lunasīns atrodams tikai sēklās un nevienā citā auga daļā. Peptīds sāk producēties 5 nedēļas pēc ziedēšanas un saglabājas nobriedušās sēklās. Tomēr Park *et al.* (2007a) publicēja pētījumus par lunasīna atklāšanu nediferencētu sojas audu kultūrā — kallusos (*callus*) — un parādīja no kallusiem izolēta lunasīna pretvēža efektus *in vitro*. Kallusi sāka producēt lunasīnu pēc 6 mēnešiem (Park *et al.*, 2007a).

Pētījumos par sojas un graudu miltu un amaranta sēklu fermentācijas izmaiņām maizes ierauga pienskābās rūgšanas procesā (Rizzello *et al.*, 2012) atklāja, ka 18-22 kDa izmēra albumīni varētu būt lunasīna prekursori, jo pēc to sašķelšanas SDS-PAGE gelā parādās lunasīna molmasai atbilstoši peptīdi. Ar ŠH-ESI-MS metodi pierādīja, ka tas patiešām ir lunasīns un ka pienskābās rūgšanas procesā lunasīna saturs ir palielinājies 2–4 reizes. *Lactobacillus curvatus* SAL33 un *Lactobacillus brevis* AM7 sintezēja visaugstāko lunasīna daudzumu visos miltu paraugos. Bez lunasīna atrada arī īsākus peptīdus, kuru struktūrā bija imūnreaktīvais motīvs RGDAAAAAAAAA. Šie pētījumi ļāva izvirzīt hipotēzi, ka lunasīna daudzums sēklās tik izteikti variē mikroorganismu iedarbības dēļ, un vienlaikus parādīja ceļu, kā iegūt funkcionālus graudu produktus.

Mēs savos pētījumos monitorējām lunasīna saturu tritikālē, miežos, ziemas rudzos un kviešos. Mēs esam pirmie, kas atklāja lunasīnu tritikālē un auzās, tāpēc nav citu autoru darbu, ar ko salīdzināt iegūtos datus. Nav arī citu autoru publikāciju, kurās būtu salīdzināts lunasīna saturs vienos un tajās pašās šķirnēs un līnijās vairāku gadu griezumā. Mūsu dati liecina, ka lunasīna saturs augos atšķiras pa ražas gadiem. Mums nebija liela rudzu un kviešu šķirņu un līniju kopa, jo mūsu primārais mērķis bija pārliecināties, vai lunasīns atrodams arī ziemas šķirnēs, jo par tā esamību graudos jau bija publikācijas. Interesanti, ka Jeong *et al.* (2009) neatrada lunasīnu visos rudzu genotipos. Lunasīna saturs graudaugu sēklās sasniedza vidēji 0,05–0,150 mg/g sēklās. Latvijā audzētajos ziemas rudzos tas bija augstāks — vidēji ap 1 mg/g sēklu. Ziemas kviešos (līnijā 99-115) lunasīna daudzums bija ļoti neliels 2011. gadā, bet 2012.

gadā tas vispār nebija izmērāms. 2011. gadā zems lunasīna saturs bija arī līnijā 94-5, bet šai līnijai 2012. gadā bija vērojams būtisks lunasīna daudzuma pieaugums, lai gan kopumā tāds lunasīna saturs tomēr nav uzskatāms par augstu. 2011. gadā vidējais lunasīna daudzums kviešu šķirnēs un līnijās bija apmēram 129 µg/g miltu, bet 2012. gadā — 36,5 µg/g miltu.

Zināmas neskaidrības par lunasīna producēšanos citos augos, nevis sojā, raisīja itāļu zinātnieku pētījumi: publicēti dati, ka graudu transkriptoma un DNS datu bāzēs nav atrastas lunasīna vai prekursorproteīna struktūrām atbilstošas struktūras (Mitchell *et al.*, 2013). Minētajā pētījumā ziņots, ka lunasīna proteīnam atbilstošs gēns atrasts tikai sojā, tāpēc šie autori uzdod jautājumu, no kā graudos rodas lunasīns. *Dinelli et al.* (2014) pētīja kviešu genotipus ar ŠH-ESI-MS metodi, mēģinot izolēt peptīdu un uztvert lunasīna hromatogrammas, kā arī centās noteikt kodējošo gēnu ar molekulārās bioloģijas metodi polikēdes reakciju (PCR), taču lunasīna standartam identisku vielu neatrada un izvirzīja hipotēzi, ka kvieši nevar sintezēt lunasīnu un tam jārodas no mikroorganismiem vai citu ķīmisku reakciju rezultātā. Mēs nemeklējām lunasīna izcelsmes avotu graudos, tomēr nelielā daudzumā lunasīnu konstatējām visās Latvijā audzētajās ziemas kviešu šķirnēs un līnijās. Salīdzinot hromatogrammas un masspektrus ar sintētiskā lunasīna spektriem, nav šaubu, ka no visām graudu šķirnēm un līnijām izolētais peptīds ir identisks sintezētajam lunasīnam.

Arī auzās vidējais lunasīna daudzums nav liels, bet kopā ar citām auzu bioloģiski aktīvajām molekulām — cieti, β glikāniem un minerālvielām — tas nostiprina auzu kā funkcionāla uztura produkta vērtību. Auzām (*Avena sativa L*) ir daudzveidīgas īpašības un plašs uzturvērtības profils (Butt *et al.*, 2008). Auzu šķiedrvielām un β glikāniem ir holesterīna līmeni pazeminoša darbība (Czerwiński *et al.*, 2004; El Khoury *et al.*, 2012; Othman *et al.*, 2011.). Auzu pārslas un auzu blakusproduktus izmanto kā papildu ārstēšanas līdzekļus pacientiem ar cukura diabētu un sirds un asinsvadu slimībām. Pirms neilga laika pierādīts, ka auzu klijas ietekmē gēnu kopas, kas saistītas ar insulīna sekrēciju un β šūnu attīstību, kā arī proteīnu sintēzi, un gēnus, kas saistīti ar vēža slimībām (Ulmius *et al.*, 2011). Meklējot auzu šķirnēs un līnijās lunasīnu, mēs arī precizējām lunasīna C gala sekvenci, jo Sebers *et al.* (2012) bija atradis vēl vienu aminoskābi un uzskatīja, ka lunasīns sastāv no 44 aminoskābēm (Seber *et al.*, 2012). Mēs papildu aminoskābi lunasīna molekulā neatradām, un arī neviens cits autors līdz šim nav apstiprinājis ideju par 44 aminoskābju atlikumiem, bet tomēr daži autori piekrīt Sebera uzskatam un publikācijās raksta, ka lunasīns ir 44 aminoskābju ķēdi saturošs peptīds (Alaswad and Krishnan, 2016).

Savos pētījumos nenovērojām lunasīna satura korelāciju ar kopējo proteīnu daudzumu graudos (Nakurte *et al.*, 2013). Vidējais auzās konstatētais β glikānu daudzums bija 3,1–4,63% koncentrācijā. Arī literatūrā norādīts, ka vidējais β glikānu daudzums ir ap 4% (Manthey *et al.*, 1999). Auzu bioloģiski aktīvo vielu spektrā lunasīns iederas ļoti labi, jo auzu ekstraktiem kopumā ir konstatēta labvēlīga ietekme uz cilvēka kardiovaskulāro sistēmu (Wong *et al.*, 2013).

Miežu šķirņu un līniju pētījumos galveno uzmanību mēs veltījām audzēšanas veida izvērtējumam. Pētījām lunasīna saturu 22 šķirnēs un līnijās un noskaidrojām, ka tas ir salīdzinoši zems. Korejā audzētos 22 miežu genotipos vidējais lunasīna saturs bija 0,4–0,6 mg/g (Jeong *et al.*, 2010). Tas ir apmēram 2–3 reizes vairāk nekā mūsu pētījumā konstatētais vidējais lunasīna līmenis, kas ir ap 0,17 mg/g graudu.

Miežos lunasīnu pirmoreiz atklāja 2002. gadā (Jeong *et al.*, 2002). Lunasīna identitāte tika pierādīta ar westernblota analīzi un masas spektrometrijas peptīdu kartēšanu tripsīna sašķeltā proteīna gēla joslā. Lunasīns bija daļēji attīrīts ar anjonu apmaiņas un imunoafinitātes hromatogrāfiju. Daļēji attīrīts lunasīns nomāca IPTG-inducētu koloniju veidošanos stabili ras-transfektētas peles fibroblastu šūnās. Šī proteīnu frakcija nomāca arī histona acetilēšanu peļu fibroblastu līnijā NIH 3T3 un cilvēka krūts dziedzeru adenokarcinomas šūnu līnijā MCF-7 histonu deacetilāzes inhibitora nātrija butirāta klātbūtnē (Jeong *et al.*, 2002). Tā tika pierādīts, ka miežos atrastais lunasīns ir bioloģiski aktīvs un ka tā aktivitāte līdzinās no sojas izolēta lunasīna aktivitātei.

Kartupeļu bumbuļos ir atrastas daudzas bioloģiski aktīvās vielas, un mēs pieļāvām, ka starp tām varētu būt arī lunasīns, jo lunasīns ir atrasts citos nakteņu dzimtas augos. Tiesa, ticamāka šķīta lunasīna producēšanās sēklās. Kartupeļu sēklas iegūst no virszemes vasas zaļajiem augļiem, un to potenciālais medicīniskais pielietojums netiek pētīts. Kā pētījuma objektu mēs izvēlējāmies 10 kartupeļu šķirnes un līnijas, un četru šķirņu un līniju sēklas, taču ne sēklās, ne bumbuļos lunasīnu nekonstatējām. Iespējams, ka, atšķirībā no citiem kultūraugiem, lunasīnu satur tikai noteikti nakteņu dzimtas augi. Jāņem vērā, ka nakteņu dzimtai pieder ļoti daudzveidīgi augi un šai dzimtai izdala daudzas ģintis, kuras ietver augļaugus, ziedaugus un dārzenus, piemēram, kartupeļus (*Solanum tuberosum L.*), tomātus, piparus, dekoratīvos augus, piemēram, petūnijas, un ārstniecības augus, piemēram, vilkogu (*Atropa belladonna L.*), velnābolu (*Datura stramonium L.*) un driģenes (*Hyoscyamus niger L.*). Velnābola, melnās naktenes un piparu sēklās ((Kwon *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2007) ir atrasts

lunasīns. Arī tas bija viens no iemesliem, kāpēc mēs pārbaudījām lunasīna producēšanos vairāku kartupeļu šķirņu un līniju sēklās un bumbuļos.

Lunasīnu neatradām arī pupās, kaut gan sojas pupas ir tik bagātas ar lunasīnu, ka varētu domāt, ka tā ir visai pākšaugu dzimtai kopēja un raksturīga īpašība.

Laboratorijas dzīvnieki tiek baroti ar barības granulām, kuras satur nepieciešamās uzturvielas un vitamīnus. Ņemot vērā literatūras datus par no sojas vai graudiem izolēta lunasīna labo biopieejamību, jo to no proteāzēm aizsargā augos esošie proteāžu inhibitori, mēs pārbaudījām hipotēzi, ka laboratorijas dzīvnieki varētu uzņemt lunasīnu no barības granulām. Šī hipotēze apstiprinājās, jo mums izdevās noteikt šī peptīda klātbūtni dzīvnieku barības granulās. Turklāt tā koncentrācija dažādu sēriju granulās bija atšķirīga $0,0206 \pm 0,001$ mg/g un $0,0719 \pm 0,001$ mg/g. Šāda lunasīna koncentrācija ir relatīvi liela, ja to salīdzina ar lunasīna saturu auzās, kas ir $0,081 \pm 0,005$ mg/g un $0,034 \pm 0,002$ mg/g. Redzams, ka lunasīna saturs barības granulās līdzinās lunasīna līmenim auzās. Barības granulas nav standartizētas pēc bioloģiski aktīvo vielu satura, bet gan pēc receptūras, un, vērtējot norādītās barības granulu sastāvdaļas (kukurūza, kvieši un sojas spraukumi), redzams, ka lunasīna klātbūtne barības granulās varētu būt skaidrojama gan ar mūsu datiem, gan *Jeong et al.* (2007) datiem par lunasīna līmeni kviešos. Noteikts, ka vienā gramā kviešu graudu ir 0,211–0,249 mg lunasīna (*Jeong et al.*, 2007). Pašlaik nav zināms, vai lunasīnu satur kukurūza un sojas spraukumi. Aprakstīts, ka sojas pupu asnošana izraisa lunasīna daudzuma samazināšanos, tāpēc nav īsti skaidrs, vai sojas asni satur lunasīnu. Nākotnē varētu pārbaudīt, vai lunasīns ir atrodams kukurūzā.

Jeong et al. (2007) pētījumā, lai noteiktu lunasīna biopieejamību peļu aknās pēc tā *per os* uzņemšanas, veica vielu hromatogrāfisku sadalīšanu un, pamatojoties uz histonu inhibīciju, noteica lunasīna biopieejamību. Šajā pētījumā tika novērota ļoti laba gan no sēklām izdalītā lunasīna, gan no peļu aknām izolētā lunasīna korelācija šūnu kodolu serdes histonu inhibīcijas testā. Tas netieši pierādīja to, ka lunasīns ir biopieejams un netiek sašķelts kuņģa-zarnu traktā gremošanas procesā (*Jeong et al.*, 2007). Šajā pētījumā peles saņēma ar lunasīnu bagātinātus kviešus, kas ļauj izdarīt pieņēmumu, ka tajos bija *Bowman–Birk* (BBI) un *Kunitz* tripsīna (KTI) inhibitori, kas pasargāja lunasīnu no sadalīšanās, un tādēļ varēja novērot lunasīna izplatīšanos audos (*Hernández- Ledesma et al.*, 2009b).

4.3. Lauksaimniecības sistēmas ietekme uz lunasīna saturu miežos

Jau jaunās tūkstošgades sākumā pieauga interese par funkcionālo pārtiku, arī par svarīgākajām pamata uzturvielām un bioloģiski aktīvām vielām, kuras varētu kalpot kā profilakses līdzekļi (Malaguti *et al.*, 2014). Šodien ir zinātniski pierādīts, ka veselu graudu un pilngraudu produktu lietošana uzturā ir saistīta ar tādu hronisku slimību kā vēzis, sirds un asinsvadu slimības, aptaukošanās un diabēts samazināšanos populācijā. Īpaša nozīme graudaugiem un pākšaugiem, kurus daudzos pasaules reģionos kultivē jau kopš seniem laikiem, ir Vidusjūras un Āzijas tautu diētā, un tie nodrošina ikdienā uzņemamo proteīnu daudzumu. Peptīdi ir proteīnu molekulas, kas mazākas par 10 kDa un var pastāvēt dabiski vai ir iegūstamas no dabīga proteīna sekvences. Peptīdi rodas galvenokārt proteīnu hidrolīzes procesā vai augu proteolītisko fermentu un mikrobu darbības rezultātā (Coda *et al.*, 2012). Bioaktīvajiem peptīdiem ir atšķirīga ietekme uz cilvēka veselību: piemēram, tiem var būt antiproliferatīvi efekti, pretmikrobu īpašības, asinsspiedienu pazeminoša iedarbība, angiotenzīnu konvertējošo enzīmu inhibējoša iedarbība, tie var pazemināt holesterīna līmeni un uzrādīt prettrombu un antioksidanta aktivitāti, uzlabot minerālu absorbciju/biopieejamību un nodrošināt opiātiem līdzīgu pretsāpju efektu (Zambrowicz *et al.*, 2013). Daudzi pētījumi liecina, ka ikdienas ēdienkartē iekļauti parastie dzīvnieku un augu izcelsmes produkti ir svarīgs bioaktīvo peptīdu avots. Augu avoti parasti ietver labību (kvieši, mieži, kukurūza, rīsi), pseidolabību (griķi un amarants), pākšaugus (soja, pupas, zirņi) un citas augu sugas (piem., saulespuķe). Bioloģiski aktīvo peptīdu klātbūtne graudaugos un pākšaugos paaugstina to kā pārtikas proteīnu avota kvalitāti un pievieno "funkcionalitāti". Kā piemēru var minēt Itālijā veiktu pētījumu, kurā parādīja, ka organiski audzētās saulespuķu sēklās ir bagātāks fitoķīmisko vielu saturs, kas apliecināja iespēju ar bioloģisko audzēšanas veidu palielināt vēlamo vielu līmeni (Picchi *et al.*, 2012).

Galvenais šī darba mērķis bija pētīt agronomijas veida un lunasīna producēšanās mijiedarbību miežos. Agronomijas veida ietekme uz bioloģiski aktīvo vielu saturu ēdamos augos ir maz pētīta. Zināms, ka augu bioaktīvie peptīdi pilda daudzas dažādas funkcijas, tai skaitā nodrošina aizsardzību pret patogēnu infekcijām un regulē augu augšanu un attīstību. Turklāt dažiem augu pārtikas peptīdiem ir izšķiroši svarīga nozīme cilvēka veselības saglabāšanā. Lai veicinātu veselībai labvēlīgu bioloģiski aktīvo peptīdu uzņemšanu ar pārtiku, ir svarīgi palielināt to koncentrāciju augu pārtikas produktos, izmantojot optimālas kultūraugu audzēšanas metodes. Jāmin, ka, lai gan ir pieejami daudzi zinātniskie ziņojumi par augu

bioloģiski aktīvo peptīdu identifikāciju un raksturošanu (Farrokhi *et al.*, 2008; Coda *et al.*, 2012; Zambrowicz *et al.*, 2013; Belovic *et al.*, 2011; Ortiz-Martinez *et al.*, 2014), ir ļoti maz pētījumu par korelāciju starp agronomijas praksi un dabisko peptīdu koncentrāciju, turklāt nav pieejami dati par hidrolīzes ceļā iegūtiem bioaktīvajiem peptīdiem (Malaguti *et al.*, 2014).

Iepriekšējos pētījumos tika parādīts, ka dažādās sojas šķirnēs lunasīna saturs mainās atkarībā no vides apstākļiem, bet līdz šim nebija veikti pētījumi, lai tieši salīdzinātu bioloģiski un konvencionāli audzētus augus. Tāpēc mēs divās augšanas sezonās novērtējām šķirnes un līnijas un vides ietekmi uz lunasīna līmeni 22 bioloģiski un konvencionāli audzētu miežu šķirnēs un līnijās (Legzdina *et al.*, 2014). Lunasīna saturs miežu graudu paraugos bija robežās no 5,0 līdz 189,0 µg/g, un kopējā vidējā vērtība bija 44,8 µg/g. Šķirne un līnija, lauksaimniecības sistēma un mijiedarbību ietekme starp šiem faktoriem uz lunasīna saturu miežu graudos bija nozīmīga ($p < 0,0001$). Vidējais lunasīna saturs organiskajā audzēšanas sistēmā ir augstāks (21,9 µg/g jeb par 64,8%) nekā tradicionālajā sistēmā. Šie rezultāti bija līdzīgi Korejā audzētiem 5 miežu genotipiem, kuriem lunasīna saturs bija 13,6–21,5 µg/g (Jeong *et al.*, 2002). Mūsu pētījumā miežu šķirņu un līniju diapazons bija lielāks, kas liecina par lielāku ģenētisko daudzveidību mūsu eksperimentā. Iespēju atlases un selekcijas ceļā iegūt sojas šķirnes ar augstu lunasīna saturu ierosināja Hernández-Ledesma *et al.* (2009a). Arī mūsu atrastā salīdzinoši lielā šķirnes un līnijas ietekme uz lunasīna saturu dažādās vidēs atbalsta iespēju izvēlēties un selekcionēt ar lunasīnu bagātus miežu genotipus. Mūsu rezultāti saskan ar Wang *et al.* (2008) ziņojumu par to, ka lunasīna koncentrācija sojas pupiņās galvenokārt ir atkarīga no šķirnes vai līnijas un zināmā mērā — arī no vides faktoriem. Tika konstatēts temperatūras un augsnes mitruma efekts un mijiedarbība starp šiem faktoriem un šķirni vai līniju. Lai gan mūsu eksperimentā lunasīna satura atšķirības, salīdzinot lauksaimniecības sistēmas, bija tikai 5,2%, bet šķirne vai līnija noteica 68,7% atšķirību lunasīna saturā, kas norāda, ka galvenā nozīme ir šķirnei vai līnijai, un abu faktoru mijiedarbība noteica 19,4% atšķirību lunasīna saturā, bioloģiska audzēšana ir laba perspektīva, un iespējams izvēlēties labības genotipu ar uzlabotu lunasīna saturu. Diemžēl kailgraudu miežu šķirnei “Irbe” lunasīna saturs bija ievērojami zem vidējā. „Irbe” ir Latvijā radīta šķirne, kas piemērota audzēšanai augstās graudu ražības dēļ. Bioloģiskai audzēšanai visdaudzsološākās miežu šķirnes un līnijas ar augstu lunasīna saturu bija “Rubiola”, PR-4407 un PR-5145. Abos pētījuma veikšanas gados augstākais lunasīna saturs šķirnei "Rubiola" tika konstatēts to audzējot organiskajā audzēšanas sistēmā. Šī ir nesen reģistrēta šķirne ar tādām agronomiskajām īpašībām, kas to padara piemērotu tieši audzēšanai bioloģiskajā lauksaimniecībā (Legzdina *et al.*, 2008). Samazinātu

lunasīna daudzumu novēroja miežu pavairošanas līnijām PR-4407 un PR-5145. Vaislas līnija PR-4121 un agrāk zināmā lietuviešu šķirne "Dziugiai" uzrādīja salīdzinoši augstu un stabilu lunasīna saturu abās lauksaimniecības sistēmās. Mēs pieņemam, ka lunasīna saturu nav ietekmējuši apstākļi šķirnes radīšanas gadā un ka tas nav zaudēts intensīvi veiktajā selekcijas darbā, jo otra vecā šķirne "Primus" abās audzēšanas sistēmās abos ražas gados uzrādīja zemu lunasīna saturu.

Meteoroloģiskajiem apstākļiem un augsnei konkrētajā ražas gadā ietekme uz lunasīna saturu bija nozīmīga tikai parastajā audzēšanas sistēmā, un tika lēsts, ka šo faktoru ietekmes apjoms ir tikai 2,4% pretstatā šķirnes vai līnijas ietekmei, kuras lielums ir 88%. Selekcionāriem noderīgi secinājumi pēc mūsu pētījuma būtu tie, ka miežu šķirnes un līnijas atšķirīgi reaģē uz lauksaimniecības sistēmām: seši no 22 šķirnēm un līnijām ievērojami vairāk lunasīna sintezēja bioloģiskās agronomijas laukos, savukārt viena līnija vairāk lunasīna sintezēja tad, ja to audzēja konvencionālajā sistēmā. Iegūtie rezultāti apliecina bioloģiski audzētas pārtikas produktu vērtību cilvēka veselības uzlabošanai. Kaut gan miežu šķirnes un līnijas nav tik bagātas ar lunasīnu kā sojas un tritikāles, mēs pierādījām, ka audzēšanai bioloģiskajā sistēmā ir nozīme, jo vienas un tās pašas šķirnes un līnijas vienādā augsnē un klimatā producē vairāk bioloģiski aktīva peptīda — lunasīna. Selekcijas darbā varētu atlasīt miežu šķirnes un līnijas, kuras producē visvairāk lunasīna, un audzēt tos bioloģiskā veidā. Mūsu pētījumā par tādu izrādījās šķirne „Rubiola”.

Mēs esam pirmie, kas pētījuši lunasīna līmeni bioloģiskajos un konvencionālajos laukos audzētos miežos. Šādi pētījumi ir bijuši un ir aktuāli, jo aizvien turpinās diskusijas par pārtikas augu audzēšanu un augā notiekošajām izmaiņām atkarībā no audzēšanas apstākļiem. *Grinder-Pedersen et al.* (2003) atzīmēja, ka bioloģiskās lauksaimniecības sistēmā audzēti graudaugi satur daudz vairāk antioksidantu un citu bioloģiski aktīvu vielu, skaidrojot to ar augu stresa faktoru, jo bioloģiskajā lauksaimniecībā mazāk izmanto agroķīmikālijas un palielinās augu saskare ar dažādiem stresa faktoriem. Organiski audzētajos produktos atrasts palielināts sekundāro augu bioaktīvo vielu un C vitamīna daudzums (*Cardoso et al.*, 2011) un par 85% augstāks flavonoīdu līmenis (*Carbonaro and Mattera*, 2001). Mūsu iegūtie rezultāti apstiprina hipotēzi, ka bioloģiskā graudu pārtika var saturēt augstāku pretvēža vielas lunasīna saturu, ja audzēšanai izvēlēta atbilstoša šķirne vai līnija. Tomēr mūsu pētījums parādīja arī izteiktas svārstības dažādu gadu ražās, un audzēšanas veidam statistiski bija mazāka ietekme kā šķirnei vai līnijai. Augstākas ražošanas izmaksas sadārdzina bioloģisko pārtiku (par 45–200%), tāpēc

tieši cena ir galvenais faktors, kas ietekmē tās patēriņu. Piemēram, lai uzlabotu veselību un samazinātu vēža risku, ieteicams ik dienu lietot uzturā 5 dārzeņu un augļu porcijas, bet bioloģiski audzētu produktu iegāde izmaksā dārgāk nekā intensīvajā (konvencionālajā) ražošanā audzēti augļi vai dārzeņi (Magkos *et al.*, 2003, 2006).

4.4. No auzām izolētā lunasīna bioloģiskā aktivitāte

Bioaktīvi peptīdi ir definēti kā "pārtikas atvasināti komponenti" (īsti vai radīti), kas papildus uzturvērtībai organismā uzrāda fizioloģisku ietekmi. Daudzos pētījumos apstiprināts, ka dzīvnieku un augu proteīnu hidrolizāti var darboties kā dažādu brīvo radikāļu ķērāji vai kā antioksidanti dažādos oksidatīvā stresa modeļos. Pēdējos gados antioksidatīvā darbība pierādīta ļoti daudziem augu proteīniem un īsākiem peptīdiem, tai skaitā sojas, kviešu, turku zirņu, kukurūzas, rapšu, kaņepju sēklu, zirņu sēklu u.c. augu paraugos. Pētījumos ar Āfrikas jansa pupu sēklām pierādīja, ka mazmolekulārie peptīdi ar augstu hidrofobitāti uzrāda labāku antioksidatīvo aktivitāti DPPH testā, tiem ir labākas metālu helātu veidošanas īpašības un lipīdu oksidēšanās samazināšanas efekts (Ajibola *et al.*, 2011). Līdzīgi secinājumi iegūti sezama sēklu peptīdu pētījumos. Autori konstatēja, ka visaugstākā antioksidantu aktivitāte ir peptīdiem ar molmasu zem 1 kDa (Das and Bhattacharjee, 2013). Lunasīns ir 5 kDa monomērs, un iespējama arī tā atrašanās organismā dimēru vai trimēru veidā, tāpēc iespējams, ka *in vivo* lunasīnam nebūtu izteikts antioksidanta efekts. Tomēr *in vitro* testos lunasīnam pierādīta pārliecinoša antioksidanta aktivitāte (García-Neboit *et al.*, 2014; Jeong *et al.*, 2010a; Hernández-Ledesma *et al.*, 2009a; Liu *et al.*, 2014). ASV ražotā uztura bagātinātāja ar lunasīnu LunaRich X lietošanas instrukcijā norādīts, ka lunasīns ir aktīvs trīs visbiežāk pētniecībā izmantotajos antioksidantu testos, ka tam novērota linoleīnskābes oksidēšanās samazināšana un ka lunasīns darbojas kā brīvo radikāļu ķērājs un samazina makrofāgu producētos skābekļa brīvos radikāļus.

Mūsu uzdevums nebija pierādīt lunasīna antioksidatīvo spēju, kas jau bija zināma, bet pārliecināties, ka no auzām izolētais peptīds ir saglabājis bioaktivitāti, jo mēs pirmo reizi parādījām lunasīna klātbūtni auzās un nebija citu literatūras datu, uz ko atsaukties. Lunasīna izolēšanai no auzu ekstrakta izmantojām šķidrums hromatogrāfiju, savācot un apkopojot eluātus (Nakurte *et al.*, 2013). Pēc tam izmērījām lunasīna koncentrāciju eluātos un pagatavojām lunasīna standartam identiskus atšķaidījumus. Lai pārliecinātos, ka lunasīns nav samazinājis šūnu skaitu un mēs tiešām pārbaudām lunasīna antioksidatīvo efektu, vispirms

proliferācijas MTT testā novērtējām lunasīna efektu uz šūnu dzīvotspēju. MTT testā konstatējām, ka lunasīns 100 μ M koncentrācijā samazina šūnu dzīvotspēju, tāpēc citos testos izmantojām lunasīnu zemākā koncentrācijā. Mūsu iegūtie rezultāti liecināja, ka auzas satur lunasīnu, kas ir bioloģiski aktīvs arī antioksidanta īpašību ziņā.

Glutationperoksidāzes (GPx) galvenā bioloģiskā loma ir pasargāt organismu no oksidatīvā stresa izraisītiem bojājumiem. Bioķīmiski GPx samazina lipīdu hidroperoksīdu un ūdeņraža peroksīda līmeni (Bhabak and Mugesh, 2010). GPx ir daudz izoformu, bet mēs nemērījām proteīnu ekspresiju un nekonzentrējām pētījumu uz izoformu ekspresiju. GPx aktivitāti ar izmantoto reaģentu komplektu mēra netieši pēc reakcijas ar glutaciona reduktāzi. Oksidētā GPx, kas veidojas, reducējot hidroksiperoksīdu un reciklējot reakcijā ar glutacionreduktāzi un NADPH, tiek atgriezta atpakaļ reducētā stāvoklī. Savukārt NADPH oksidēšana par NADP izraisa absorbcijas blīvuma samazināšanos pie 340 nm. Šī optiskā blīvuma (OD) samazināšanās ir proporcionāla GPx aktivitātei. GPx aktivitātes palielināšana līdz šim lunasīnam nebija aprakstīta.

Lunasīna antioksidatīvā darbība tiek uzsvērta, runājot par tā pretvēža un pretiekaisuma darbību, jo tās ir cieši saistītas. Tāpēc šie testi ir nozīmīgi lunasīna kā potenciālas zāļu vielas izvērtējumā.

4.5. Lunasīna molekulas potenciāls jaunu zāļu dizainā

Lunasīns augos nav tik lielā koncentrācijā, lai būtu izdevīgi to ekstrahēt lielos daudzumos un uzskatīt ekstrahēšanu par izdevīgu peptīda ieguves veidu. Peptīda sintēze ir dārga. Parasti peptīdu pētniecībā meklē īsākus peptīdus un pēc aktīvu mazmolekulāro peptīdu atklāšanas meklē iespējas veikt struktūras pāreju uz organiskām molekulām. Augu pētījumi kalpo tam, lai atklātu jaunas struktūras ar interesantu darbības mehānismu. Rekombinētā lunasīna radīšana ir pavērusi biotehnoloģisku ceļu lunasīna iegūšanai (Kyle *et al.*, 2012; Aleksis *et al.*, 2016), tomēr tas vēl nav komerciāli pieejams. Starplaikā jau ir sākusies lunasīna kā uztura bagātinātāja tirgošana, un to veicina lunasīna izcelsme no ēdamiem augiem. Patiešām — līdz šim pētījumos lunasīnu saturošiem produktiem nav konstatētas nekādas blakusparādības vai toksicitāte. Tomēr tā alergēna īpašības vēl nav pētītas, un daži autori uzskata, ka lunasīna spēja pazemināt holesterīna līmeni varētu būt saistīta ar būtiskiem blakusefektiem, ja holesterīna līmenis samazinātos pārmērīgi. No augiem izolētais lunasīns nav 100% tīrs, un uzskata, ka tieši

citu proteīnu apvalks pasargā lunasīnu no sagremošanas kuņģa-zarnu traktā. Sintētiskais lunasīns tiek ātri sagremots, un tas varētu būt šķērslis *per os* zāļu formu radīšanai. Iespējams, ka nākotnē lielāks potenciāls būs īsākiem lunasīna fragmentiem un tiks atrastas jaunas zāļu formas sintētiskā peptīda “iepakošanai” citā formā, līdzīgi kā gadījumos, kad zāļu vielas iepilda nanodaliņu cietajā režģī vai liposomās. Pašlaik lunasīnam kā netoksiskam vēža profilakses vai papildterapijas līdzeklim nākotnē prognozē lielus panākumus (Dia and de Mejia, 2013). No sojas izolētu lunasīnu ar 95% tīrības pakāpi ievadot pelēm *per os* un intraperitoneāli zarnu vēža modelī, novēroja zarnu vēža metastāžu samazināšanos, bet nenovēroja, ka nozīme būtu lunasīna ievadīšanas veidam, jo efekts neatšķīrās un metastāzes par 50% samazinājās gan pēc *per os*, gan intraperitoneālas ievadīšanas (Dia and de Mejia, 2013). Iepriekš bija novērots, ka intraperitoneāli injicēts lunasīns potencē oksaliplatīna pretvēža efektu (Dia and de Mejia, 2011b). Tie gan vēl ir tikai dzīvnieku eksperimenti, taču tie liecina, ka lunasīnu var ievadīt *per os* un izmantot vēža terapijā kā papildlīdzekli.

Nozīmīgāko lunasīna pētnieku *Alfredo Galvez, de Lumen, Elvira Gonzalez de Mejia* un *Vermont P. Dia* publikācijās minēti šādi labvēlīgi lunasīna efekti:

- epiģenētisks darbības veids;
- dabas produkts;
- vispārpieņemts kā lietošanai drošs;
- ideāla hemoprotektīva pretvēža darbība;
- pretnovecošanās efekts;
- antioksidanta efekts;
- pretiekaisuma efekts;
- minimālas efektīvās devas;
- neinvazīva lietošana (Lule *et al.*, 2015).

Arī jaunākie lunasīna pētījumi joprojām ir vērsti uz tā pretvēža darbības izpēti. Kolorektālajam vēzim ir raksturīgi metabolisma traucējumi, un pētnieki ir pētījuši, kā lunasīns ietekmē vēža cilmes šūnu augšanu, dzīvotspēju un iedzīvošanos cilvēka HCT116 šūnu līnijā, kuru kultivēja kopā ar lunasīnu 2 μM koncentrācijā, metformīnu 60 μM koncentrācijā un citiem sojas komponentiem, piemēram, genisteīnu 2 μM koncentrācijā un β konglicinīnu un glicinīnu 3 μM koncentrācijā. Šīs vielas inhibēja šūnu augšanu un vēža cilmes šūnu sfēru veidošanos (Montales *et al.*, 2015). Lunasīns potencēja metformīna efektu, kas norāda uz tā potenciālu piemērotību diabēta slimnieku ārstēšanā.

Arī pētot nesīkšūnu plaušu vēža šūnu dzīvotspēju lunasīna klātbūtnē, konstatēja, ka lunasīns nonāvē vēža šūnas, bet neietekmē normālu bronhu epitēlija šūnu dzīvotspēju (McConnell *et al.*, 2015). Par lunasīna darbības mehānismu šie autori uzskata retinoblastomas proteīna fosforilēšanās inhibīciju, kas rodas samazinātā fosforilētā Akt līmeņa dēļ.

Daži pētnieki (Pabona *et al.*, 2013) uzskata, ka lunasīnu saturoša funkcionālā pārtika dod lielāku ieguvumu nekā uztura bagātinātāji. Tas secināts, salīdzinot lunasīna un genisteīna efektus un nekonstatējot atšķirības. Tāpēc tika vispārināts, ka nav vērts izdalīt no sojas lunasīnu, bet vērtīgāk ir uzturā lietot sojas produktus. Tomēr komerciāli izdevīgāk ir tirgot uztura bagātinātājus ar lunasīnu, jo ne visi cilvēki vēlas lietot sojas pārtikas produktus. Tāpēc sojas pētnieki joprojām cenšas uzlabot metodes lunasīna iegūšanai no sojas, un ir aprakstīta metode, kurā lunasīnu izgulsnē no metanola šķīduma ar kalciju (Krishnan and Wang, 2015). Šādi izgulsnētais produkts satur trīs proteīnus ar molmasu 21, 14 un 5 kDa. Izgulsnētais 5 kDa peptīds ir lunasīns.

Līdz šim ļoti maz ir pētīta lunasīna fragmentu bioloģiskā aktivitāte. HepG2 šūnu barotnē lunasīna klātbūtnē 10 μM koncentrācijā pēc 2 h sākas fragmentācija, un pēc 20 h pētnieki vairs neatrada pilnu molekulu (Fernandez-Tome *et al.*, 2014).

Izmērāmā daudzumā barotnē atrada tikai C gala fragmentus:

F1, f(32-43), GRGDDDDDDDDDD

F2, f(30-43), IQGRGDDDDDDDDDD

F3, f(29-43), KIQGRGDDDDDDDDDD

F4, f(26-43), IMEKIQGRGDDDDDDDDDD

F5, f(25-43), HIMEKIQGRGDDDDDDDDDD

To vidū dominēja 5. frakcija lunasīns 25-43. Tāpēc uzskata, ka šim fragmentam ir vislielākā bioloģiskā aktivitāte. Patiešām lunasīna 25-43 C gala lunasīna fragmentam varētu būt vislielākā loma lunasīna struktūrā, jo N galam nav konstatēti nekādi bioloģiskie efekti. Iespējams, ka lunasīna N gala struktūra bija sadalījusies līdz atsevišķām aminoskābēm, tāpēc pētnieki atrada tikai dažādus C gala fragmentus. Iespējams arī, ka lunasīns ir internalizējies šūnās un tāpēc barotnē vairs nebija atrodams. Noskaidrots, ka šūnu līnijai ir loma lunasīna stabilitātē, jo, piemēram, Caco-2 šūnu līnijai pievienotais lunasīns bija stabils 24 h un fragmentu rašanos nenovēroja (García-Nebot *et al.*, 2014).

Ņemot vērā N gala nestabilitāti, ir piedāvāta vēl viena metode rekombinētā lunasīna iegūšanai, kurā N galu aizsargā, lai iegūtu neizmainītas struktūras lunasīnu. Pie lunasīna N gala pievieno pH inducētu pašnošķelšanās struktūru Ssp DnaB mini inteīnu, kas pievienots hitīna saistīšanas domēnam. Šādi sagatavotu proteīnu (*fusion protein*) bioreaktorā ar laktozes palīdzību ekspresē zarnu nūjiņās. Proteīns piesaistās pie hitīna afinitātes kolonnas un, mainot pH un temperatūru, var panākt pievienotā inteīna atšķelšanos. Tā tiek iegūts attīrīts lunasīns koncentrācijā 75 mg litrā (Setrerrahmane *et al.*, 2014). Pārrēķinot uz molāro koncentrāciju, tā ir 15 mM. Minētajās publikācijās *in vitro* pētījumos lunasīnu šūnu kultūrām pievieno dažādās koncentrācijās, bet visbiežāk no 0,1 līdz 20 μ M koncentrācijā. Tātad iegūto lunasīna šķīdumu var atšķaidīt 1000 un vairāk reižu. *In vivo* eksperimentos lunasīns ir izmantots aplikācijās uz ādas, ievadīts intraperitoneāli un *per os*, kā arī intracisternāli, un izmantotās devas ir bijušas dažādas.

5. SECINĀJUMI

1. Ieviestā cietfāzu ekstrakcija un elektroizsmidzināšanas šķidrums hromatogrāfijas masspektrometrijas optimizācija ļauj identificēt un kvantitatīvi noteikt lunasīnu pēc tā molekulārajiem joniem. Izstrādātā metode būtiski uzlabo lunasīna ekstrahēšanu no augu materiāla, un lunasīna molekulāro jonu masas spektru izmantošana atvieglo peptīda fragmentu identificēšanu un molmasas aprēķināšanu.
2. Lunasīns atklāts tritikālē un auzās, kā arī ziemas rudzu un kviešu šķirnēs un līnijās. Pierādīts, ka lunasīna daudzums augos variē. Atrastas ar lunasīnu bagātākās šķirnes un līnijas un parādīts selekcijas virziens, meklējot līnijas ar lielāku lunasīna producēšanās spēju. Tritikāle ir ar lunasīnu bagātākais līdz šim zināmais graudaugs.
3. Pirmoreiz pierādīts, ka lunasīna producēšanos miežos visvairāk ietekmē tieši šķirne vai līnija. Atrastas bioloģiskajai lauksaimniecībai piemērotas ar lunasīnu bagātākas šķirnes un līnijas. Īpaši piemērota ir Latvijā radītā šķirne „Rubiola”. Parādīta iespēja atlasīt un selekcionēt bioloģiskajai lauksaimniecībai piemērotas miežu šķirnes.
4. Lunasīns neproducējas kartupeļos un kartupeļu sēklās.
5. Lunasīns atklāts laboratorijas dzīvnieku barības granulās, kas satur sojas, kukurūzas un graudu piedevas.
6. No auzām izolētais lunasīns ir bioloģiski aktīvs, un tā efekti antioksidantu testos *in vitro* neatšķiras no sintētiskā lunasīna efektiem.
7. Graudaugos lunasīns ir plaši izplatīts, bet tā daudzumi nav pietiekoši lunasīna ekstrahēšanai pētnieciskiem nolūkiem un nav pietiekoši klīniskajiem pētījumiem. Tomēr augos peptīds ir bioloģiski aktīvs un no graudiem izolēto lunasīnu var izmantot farmakoloģiskās darbības mehānisma un biopieejamības noskaidrošanai.

6. PĒTĪJUMU REZULTĀTU PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI

Rezultāti publicēti četrās (4) starptautiski citējamu žurnālu publikācijās:

1. Nakurte, I., Klavins, K., Kirhnere, I., **Namniece, J.**, Adlere, L., Matvejevs, J., Kronberga, A., Kokare, A., Strazdina, V., Legzdina, L., Muceniece, R. Discovery of lunasin peptide in triticale (X Triticosecale Wittmack). Journal of Cereal Science, 2012, 56 (2), 510-514.
2. Nakurte, I., Kirhnere, I., **Namniece, J.**, Saleniece, K., Krigere, L., Mekss, P., Vicupe, Z., Bleidere, M., Legzdina, L., Muceniece, R. Detection of the lunasin peptide in oats (Avena sativa L). Journal of Cereal Science, 2013, 57 (3), 319-324.
3. Legzdina L., Nakurte I., Kirhnere I., **Namniece J.**, Krigere L., Saleniece K., Beinarovica I., Muceniece R. Up to 92 % increase of cancer-preventing lunasin in organic spring barley. Agronomy for Sustainable Development, 2014, 34 (4), 783-791.
4. Muceniece R., **Namniece J.**, Nakurte I., Jekabsons K., Riekstina U., Jansone B. Pharmacological research on natural substances in Latvia: Focus on lunasin, betulin, polyprenol and phlorizin. Pharmacol Research. 2016 , Nov; 113(Pt B):760-770.

Par pētījumu rezultātiem zinots konferencēs (kopā: 9, no kurām starptautiskās -4, vietējās - 5):

Starptautiskās konferences:

1. Klavinsh K., Nakurte I., Kirhnere I., Skrabule I., Legzdina L., Mekss P., **Namniece J.**, Muceniece R. Isolation and determination of cancer preventing peptide lunasin from barley flour using LC-ESI-MS. NoSS, Rīga, Latvia, 2011, August 24-27, 61 p.
2. **Namniece J.**, Nakurte I., Riekstina U., Legzdina L., Muceniece R. Identification of structure of peptide lunasin isolated from oats. International conference Crop breeding and management for environmentally friendly farming: research results and achievements. Priekuļi, Latvija, 2013, June 4.-6, 51.p.
3. Z.Dzirkale, K.Jekabsons, **J.Namniece**, I.Nakurte, S.Svirskis, J.Rumaks, R.Muceniece, V.Klusa. Biologically active seed peptide lunasin and its influence on the CNS. World Congress

of Pharmacy&Pharmaceutical Sciences, 73rd International Congress of FIP, Aug 31 – Sept 5, 2013, Dublin, Ireland. Poster No.NPR-P-16.

4. V. Klusa, Z. Dzirkale, I. Nakurte, K. Jekabsons, **J. Namniece**, J. Rumaks, A. Rinkens, A. Allikalt, R. Muceniece. Lunasin molecule: a source for the design of novel antipsychotics. International conference InnovaBalt, August 28-29. Riga, Latvija.69.p.

Vietējās konferences:

1. Kirhnere, J. Matvejevs, V. Grantiņa, J. Kurlovičs, V. Piļipenko, A. Aišpure, I. Nakurte, **J. Namniece**, P. Mekšs, L. Legzdiņa, R. Muceniece. Peptīda lunasīna kvantitatīvās noteikšanas metožu izstrādāšana un salīdzināšana. Latvijas Universitātes 70. zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums. Rīga, 2012.g. 2. febr. 22. lpp.

2. Z.Dzirkale, **J. Namniece**, I.Nakurte, K. Jēkabsons, J.Rumaks, Š.Svirskis, B. Jansone, V. Kluša, R. Muceniece. Lunasīna centrālie efekti. Latvijas Universitātes 71. zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums. Rīga, 2013.g. 15. febr. 19. lpp.

3. **J. Namniece**, I.Nakurte, A. Laizāne, K. Jēkabsons, L. Legzdiņa, A Kronberga, Z. Vicupe, M. Bleidere, R. Muceniece. No auzu ekstraktiem izdalītā peptīda lunasīna antioksidatīvie efekti. Latvijas Universitātes 71. zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums. Rīga, 2013.g. 15. febr. 22. lpp.

4. I. Nakurte, **J. Namniece**, L. Krīgere, K. Saleniece, R. Muceniece. Augsti efektīvas šķidrums hromatogrāfijas-tandēma spektrometrijas ar elektroizsmidzināšanu (AEŠH-ESI-MS/MS) metodes izmantošana peptīda lunasīna noteikšanai graudu ekstraktos. Latvijas Universitātes 71. zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums. Rīga, 2013.g. 15. febr. 28. lpp.

5. **J. Namniece**, I. Popēna, K. Jēkabsons, I. Kozlovska, D. Butikova, U. Riekstiņa, R. Muceniece. Peptīda lunasīna ietekme uz žurku gliomas C6 šūnu līnijas un interleikīna 10 un cilvēku neuroblastomas SH-SY5Y šūnu līnijas interleikīna 8 sekrēciju. LU 72. zin. konference, 2014.g. 14.febr. 17-19.

7. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību visiem, kas sniedza morālo atbalstu, deva noderīgus padomus un finansiāli ļāva paveikt šo man tik nozīmīgo darbu.

Vislielāko pateicību vēlos izteikt savai darba vadītājai, sirsnīgam cilvēkam un lieliskai profesorei Dr. hab. biol. Rutai Muceniecei par pretimnākošo attieksmi visu studiju gadu (bakalaura, maģistra un doktora studiju) laikā. Paldies par ieteikumiem maģistra darba tapšanā, par disertācijas izstrādes gaitā sniegtajiem ieteikumiem, palīdzību un atbalstu. Paldies par cilvēcīgāko un saprotošāko attieksmi, ar kādu studiju laikā esmu saskārusies. Paldies par doto iespēju būt doktorantu rindās un gūt fantastisku pieredzi akadēmiskajā un zinātniskajā darbā.

Vislielākais paldies arī maniem mīļajiem— manai ģimenei par emocionālo atbalstu un sapratni. Īpašs paldies vecākiem — paldies, ka jūs devāt milzu artavu manai nākotnei.

Paldies Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes kolēģiem par noderīgajiem padomiem un patīkamo darba vidi. Īpašs paldies Dr. ķīm. Ilvai Nakurtei par atbalstu, pacietību un palīdzības sniegšanu; Priekuļu Laukaugu selekcijas institūta un Valsts Stendes Graudaugu selekcijas institūta pētniekiem; asoc. prof. Unai Riekstiņai par padomiem dažādu jautājumu sakarā; Dr. farm. Zanei Dzirkalei par atbalstu; Kasparam Jēkabsonam par pacietību, apmācot *in vitro* eksperimentu veikšanā; Dr. farm. Ulrikai Beitnerai; Dr. med. Evitai Rostokai un citiem.

Paldies maniem „SIA Latvijas aptieka” kolēģiem par izpalīdzību un atbalstu brīžos, kad man tas bija vajadzīgs.

Pateicos par iespēju veikt pētījumus ar finansiālo atbalstu. Paldies par finansējumu ESF projektam Nr. Nr.426 2009/0218/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/099, kā arī doktorantūras projektam D-715005d-ST-N-840.

Pateicos par doktorantūras laikā saņemto stipendiju ESF projekta „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” Nr. 2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/004 ietvaros.

Pateicos par iespēju piedalīties Latvijas-Lietuvas-Taivānas projekta „Mezenhimālo cilmes šūnu un audzēja cilmes šūnu reakcija uz nanodaļiņām”, projekta Nr. 11-13/IZM 14-13, LU Nr.FP-2937-ZF-N-840 realizācijas darba grupā. Tā bija lieliska iespēja apgūt jaunas darba metodes šūnu laboratorijas darbā un gūt pieredzi kā brīvprātīgajai šī projekta realizācijā. Bez finansiālā atbalsta būtu sarežģītāk realizēt studiju un pētniecības darbu veiksmīgai doktora studiju programmas izpildei.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Aguzzi MS, Fortugno P, Giampietri C, Ragone G, Capogrossi MC, Facchiano A.** Intracellular targets of RGDS peptide in melanoma cells. *Molecular Cancer* 2010, 9, 84–94.
2. **Alaswad AA, Krishnan HB.** Immunological Investigation for the Presence of Lunasin, a Chemopreventive Soybean Peptide, in the Seeds of Diverse Plants. *J Agric Food Chem.* 2016 Apr 13;64(14):2901-9. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00445.
3. **Aleksis R, Jaudzems K, Muceniece R, Liepinsh E.** Lunasin is a redox sensitive intrinsically disordered peptide with two transiently populated α -helical regions. *Peptides*, 2016,85,56-62.
4. **Ajibola CF, Joseph B. Fashakin JB, Tayo N. Fagbemi TN, Rotimi E. Aluko RE.** Effect of Peptide Size on Antioxidant Properties of African Yam Bean Seed (*Sphenostylis stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. *International Journal Molecular Science*, 2011,12(10), 6685–6702.
5. **Akiyama SK, Aota S, Yamada KM.** Function and receptor specificity of a minimal 20-Kilodalton cell adhesive fragment of fibronectin. *Cell Adhesion and Communication*, 1995, 3, 13-25.
6. **Anderson JW, Smith BM, Washnock CS.** Cardiovascular renal benefits of dry bean and soybean intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 70, 464S-474S.
7. **Annesley TM.** Ion suppression in mass spectrometry *Clinical Chemistry*, 2003, 49, 1041–1044.
8. **Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Atiba J, McLaren E, Meyskens FL.** Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2000, 9, 43-47, ISSN 1055-9965.
9. **Armstrong WB, Wan XS, Kennedy AR, Taylor TH, Meyskens FL.** Development of the Bowman-Birk inhibitor for oral cancer chemoprevention and analysis of neu immunohistochemical staining intensity with Bowman-Birk inhibitor concentrate treatment. *Laryngoscope*, 2003, 113, 687-1702, ISSN 0023-852X.

10. **Aubry AF.** LC-MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. *Bioanalysis*, 2011 3(16), 1819-1825. doi: 10.4155/bio.11.166.
11. **Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK.** Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279, 51163-51171, ISSN 00219258.
12. **Balunas MJ, Kinghorn AD.** Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 2005, 22;78(5),431-441.
13. **Bartłomiej S, Justyna RK, Ewa N.** Bioactive compounds in cereal grains - occurrence, structure, technological significance and nutritional benefits - a review. *Food Science Technology International*, 2012 18(6), 559-568.
14. **Belovic MM, Mastilović JS, Torbica AL, Tomić JM, Stanić DR, Džinić NR.** Potential of bioactive proteins and peptides for prevention and treatment of mass non-communicable diseases. *Food Feed Research*, 2011, 38, 51–61.
15. **Bhabak KP, Mugesh G.** "Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants". *Accounts of Chemical Research* 2010, 43 (11), 1408–1419.
16. **Bhutia SK, Maiti TK.** Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26, 210-217, ISSN 0167-7799.
17. **Borneo R, León AE.** Whole grain cereals: functional components and health benefits. *Food and Function*, 2012, 3(2):110-119. doi: 10.1039/c1fo10165j.
18. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 1995, 28, 25–30.
19. **Butt MS, Tahir-Nadeem M, Khan MKI, Shabir R, Butt MS.** Oat: unique among the cereals. *European Journal of Nutrition*, 2008, 47, 68-79.
20. **Bylund A, Lundin E, Zhang, JX, Nordin A, Kaaks R, Stenman U-H, Åman P, Adlercreutz H, Nilsson TK, Hallmans G, Bergh A, Stattin P.** Randomised controlled short-term intervention pilot study on rye bran bread in prostate cancer *European Journal of Cancer Prevention*, 2003, 12 (5), 407-415.

21. **Coward L, Barnes N, Setchell K, Barnes S.** Genistein, daidzein, and their betaglycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean food from American and Asian diets. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1993, 41, 1961-1967.
22. **Cam A, de Mejia EG.** RGD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF- κ B activation in human macrophages through interaction with the α V β 3 integrin. *Molecular Nutrition Food Research*. 2012, 56,1569–1581.
23. **Cam A, Sivaguru M, Gonzalez de Mejia E.** Endocytic mechanism of internalization of dietary peptide lunasin into macrophages in inflammatory condition associated with cardiovascular disease. *PLoS One*. 2013 Sep 5;8(9):e72115. doi: 10.1371/journal.pone.0072115. eCollection 2013.
24. **Carbonaro M, Mattera M.** Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. Regina bianca) and pear (*Pyrus communis* L., cv. Williams). *Food Chemistry*, 2001, 72(4), 419-424.
25. **Cardoso PC, Tomazini APB, Stringheta PC, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant Ana HM.** Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. *Food chemistry*, 2011, 126, 411-416.
26. **Cheeseman KH, Slater TF.** An introduction to free radical biochemistry. *British Medicine Bulletin*, 1993, 49: 481-493.
27. **Chin YW, Balunas M, Chai H, Kinghorn AD.** Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 2006, 8, 239–253.
28. **Cho SS, Qi L, Fahey GC Jr, Klurfeld DM.** Consumption of cereal fiber, mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *American Journal Clinical Nutrition*, 2013, 98(2), 594-619. doi: 10.3945/ajcn.113.067629.
29. **Clemens R, van Klinken BJ.** Oats, more than just a whole grain: an introduction. *British Journal of Nutrition*, 2014, 112 Suppl 2:S1-3.
30. **Cochrane Database of Systematic Reviews: Plain Language Summaries.** Wholegrain cereals for coronary heart disease This version published: 2009; Review content assessed as up-to-date: January 14, 2007. [Tiešsaite: 2015.02.20.]. Pieejams: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0013206/>
31. **Coda R, Rizzello CG, Pinto D, Gobbetti M.** Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied Environmental Microbiology*, 2012, 78, 1087–1096.

32. **Czerwiński, J., Bartnikowska, E., Leontowicz, H., Lange, E., Leontowicz, M., Katrich, E., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S.** Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004, 15, 622-629.
33. **Dalvai M, Bystricky K.** The role of histone modifications and variants in regulating gene expression in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2010, 15, 19-33, ISSN 1083-3021.
34. **Das R, Bhattacharjee C.** In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity and Radical Scavenging Activity of Sesame Bioactive Peptides. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2013, 3 (11), 521-527.
35. **Dhami N.** Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines. *Journal of herbal medicine*, 2013, 3, 123–131.
36. **de Lumen BO.** Lunasin: A Cancer-Preventive Soy Peptide. *Nutrition Reviews*, 2005, 63, 6-21.
37. **de Mejia EG, Bradford T, Hasler C.** The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutrition Reviews*, 2003, 61, 239-246.
38. **de Mejia EG, Dia VP.** Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kappaB pathway in the macrophage. *Peptides*, 2009,12,2388-98.
39. **de Mejia EG, Dia VP.** The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metastasis Review*, 2010, 29(3), 511-528. doi: 10.1007/s10555-010-9241-4
40. **de Mejia, EG, Prisecaru VI.** Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45, 425-455.
41. **de Mejia EG, Vasconez M, de Lumen BO.** Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52,5882 – 5887.
42. **de Mejia EG, Wang W, Dia VP,** Lunasin, with an arginine-glycineaspartic acid motif, causes apoptosis to L1210 leukemia cells by activation of caspase-3, *Molecular Nutrition Food Research*, 2010, 54, 406-414.

43. **de Munter JSL, Hu FB, Spiegelman D.** Whole grain, bran, and germ intake and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and systematic review. *PLoS Med.* 2007;4:1385–1395.
44. **Dia VP, de Mejia EG.** Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in human metastatic colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011a, 55, 623-634, ISSN 1613-4133.
45. **Dia VP, de Mejia EG.** Lunasin Potentiates the Effect of Oxaliplatin Preventing Outgrowth of Colon Cancer Metastasis, Binds to Alpha 5 Beta 1 Integrin and Suppresses FAK/ERK/NF-Kappa B Signaling, *Cancer Letters*, 2011b, 313, 167-180. doi:10.1016/j.canlet.2011.09.002.
46. **Dia VP, de Mejia EG.** Potential of Lunasin Orally-Administered a in Comparison to Intraperitoneal Injection to Inhibit Colon Cancer Metastasis *in Vivo*. *Journal of Cancer Therapy*, 2013, 4, 34-43.
47. **Dia VP, Frankland-Searby S, del Hierro FL, Garcia G, de Mejia EG.** Structural property of soybean lunasin and development of a method to quantify lunasin in plasma using an optimized immunoassay protocol. *Food Chemistry*, 2013, 138, 334-341. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.101.
48. **Dia VP, Wang W, Oh VL, de Lumen BO, de Mejia EG.** Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, 2009, 114, 108-115.
49. **Dinelli G, Bregola V, Bosi S, Fiori J, Gotti R, Simonetti E, Trozzi C, Leoncini E, Prata C, Massaccesi L, Malaguti M, Quinn R, Hrelia S.** Lunasin in wheat: a chemical and molecular study on its presence or absence. *Food Chemistry*, 2014, 151, 520-525. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.119.
50. **Dzirkale Z, Rumaks J, Svirskis S, Mazina O, Allikalt A, Rinken A, Jekabsons K, Muceniece R, Klusa V.** Lunasin- induced behavioural effects in mice: focus on the dopaminergic system. *Behav Brain Res.* 2013 Nov 1;256:5-9. doi:10.1016/j.bbr.2013.08.002. Epub 2013 Aug 8.
51. **El Khoury D, Cuda C, Luhovyy BL, Anderson GH.** Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012:851362. doi:10.1155/2012/851362.

52. **Erdman Jr, J, Jadger T, Lampe J, Setchell KDR, Messina M.** Not all soy products are created equal: caution needed in interpretation of research results. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134, 1229-1233.
53. **Farrokhi N, Whitelegge JP, Brusslan JA.** Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6, 105–134.
54. **Fernandez-Tome S, Herrera IC, Hernández-Ledesma B, Ramos S, Recio I, Goya L.** In vitro chemo-protective effect of bioactive peptide lunasin against oxidative stress in human HepG2 cells. *Food Research International*, 2014, 62(1),793-800.
55. **Fournier DB, Erdman JW Jr., Gordon GB.** Soy, its components, and cancer prevention: a review of the in vitro , animal, and human data. *Cancer Epidemiological Biomarkers Preview*, 1998, 7, 1055-1065.
56. **Fukudome S, Yoshikawa M.** Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Letters* 1992, 296(1),107-111.
57. **Galvez AF.** Identification of Lunasin as the Active Component in Soy Protein Responsible for Reducing LDL Cholesterol and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*, 2012,126, A10693.
58. **Galvez AF, Chen N, Macasieb J, de Lumen BO.** Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation. *Cancer Research*, 2001, 61, 7473-7478.
59. **Galvez AF, de Lumen BO.** A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 495-500.
60. **Galvez AF, Revilleza MJR, de Lumen BO.** A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA (accession No. AF005030). Plant Register #PGR97-103. *Plant Physiology*, 1997, 114, 1567–1569.
61. **García-Nebot MJ, Recio I, Hernández-Ledesma B.**Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry Toxicology*, 2014,65,155-161.
62. **Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Sowter HM, Delhanty JDA, Ponder BAJ, Kouzarides T, Caldas C.** Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nature Genetics*, 2000, 24, 300-303, ISSN 1061-4036.

63. **Grinder-Pedersen L, Rasmussen SE, Bügel S, Jørgensen LV, Dragsted LO, Gundersen V, Sandström B.** Effect of diets based on foods from conventional versus organic production on intake and excretion of flavonoids and markers of antioxidative defense in humans. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2003, 51, 5671-5676.
64. **Good CK., Holschuh N., Albertson AM.** Whole grain consumption and body mass index in adult women: an analysis of NHANES 1999–2000 and the USDA pyramid servings database. *Journal of American College Nutrition*, 2008, 27,80–87.
65. **Goodman MT, Wilkens LR, Hankin JH, Lyu LC, Wu AH, Kolonel LN.** Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *American Journal of Epidemiology*, 1997, 164, 294-306.
66. **Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC.** Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 2010, 1217,3929–3937.
67. **Guijarro-Díez M, García MC, Crego AL, Marina ML.** Off-line two dimensional isoelectrofocusing-liquid chromatography/mass spectrometry (time of flight) for the determination of the bioactive peptide lunasin. *Journal of Chromatography A.*, 2014, 18;1371C,117-124.
68. **Gul S, Ahmed S, Kifli N, Uddin QT, Batool Tahir N, Hussain A, Jaafar HZ, Moga M, Zia-Ul-Haq M.** Multiple pathways are responsible for anti-inflammatory and cardiovascular activities of *Hordeum vulgare* L. *Journal Translation Medicine*, 2014, 12:316. doi: 10.1186/s12967-014-0316-9.
69. **Gurib-Fakim A.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27, 1–93.
70. **Hasler CM.** Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *Journal Nutrition*, 2002,132, 3772-3781.
71. **Helt AM, Galloway DA.** Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis*, 2003, 24, 159-169, ISSN 0143-3334.
72. **Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO.** Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 2009a, 390, 803-805.

73. **Hernández-Ledesma, B.; Hsieh, C.-C. & de Lumen, B.O.** Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods. *Food Chemistry*, Vol. 115, No. 2, July, 2009b, pp. 574-580.
74. **Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO.** Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*. 2009c; 30(2):426-30.
75. **Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO.** Relationship between lunasin's sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, 55, 989-998. doi: 10.1002/mnfr.201000632.
76. **Hernández – Ledesma B, Hsieh CC.** Bioactive Food Peptides in Health and Disease. *Rijeka: InTech*, 2013, 3 – 17.
77. **Holliday, R.** Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics*, 2006, 1:2, 76-80.
78. **Hook V, Bark S, Gupta N, Lortie M, Lu WD, Bandeira N, Funkelstein L, Wegrzyn J, O'Connor DT, Pevzner P.** Neuropeptidomic components generated by proteomic functions in secretory vesicles for cell-cell communication. *AAPS Journals*, 2010, 2, 635 – 645.
79. **Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, Jeong HJ, Park JH, de Lumen BO.** Complementary Roles in Cancer Prevention: Protease Inhibitor Makes the Cancer Preventive Peptide Lunasin Bioavailable. *PlosOne*, 2010a, 5, e8890. [elektronisks žurnāls] [Pieejams: <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0008890>] [Tiešsaite: 2014.12.12.]
80. **Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, de Lumen, B.O.** Soybean peptide lunasin suppresses in vitro and in vivo 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced tumorigenesis. *Journal of Food Science*, 2010b, 75, H311-H316.
81. **Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, de Lumen BO.** Lunasin, a novel seed peptide, sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to aspirin-arrested cell cycle and induced-apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 2010c, 186, 27-134, ISSN 0009-2797.
82. **Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, de Lumen BO.** Lunasin-aspirin combination against NIH/3T3 cells transformation induced by chemical carcinogens. *Plant Foods Human Nutrition*, 2011, 66(2),107-113. doi: 10.1007/s11130-011-0229-1.

83. **Hsieh EA, Chai CM, de Lumen BO, Nesse RA. and Hellerstein, M.K.** Dynamics of keratinocytes in vivo using (H20)-H2 labeling: a sensitive marker of epidermal proliferation rate. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2004, 123, 530-536.
84. **Huber M, Rembialkowska E, Średnicka D, Bügel S, van de Vijver LPL.** Organic food and impact on human health: Assessing the status quo and prospects of research. *NJAS – Wagening. Journal of Life Science*, 2011, 58, 103-109.
85. **Jacobsen BK, Knutsen SF, Fraser GE.** Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist health study (United States). *Cancer Causes Control*, 1998, 9, 553-557.
86. **Jeong JB, De Lumen BO, Jeong HJ.** Lunasin peptide purified from Solanum nigrum L. protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Letters*, 2010a, 293(1),58-64.
87. **Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, Park JH, Lee JB, Kweon D, Gyu Young Chung GY, Seo EW, de Lumen BO.** The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters*, 2007, 55, 42–48.
88. **Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS.** Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide lunasin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007a, 55 (3), 632 – 637.
89. **Jeong JB, Jeong HJ, Park JH.** Cancer – preventive peptide lunasin from Solanum nigrum L. Inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastomas protein (Rb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007b, 55 (26), 10707 – 10713.
90. **Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, de Lumen BO.** Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide Lunasin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,. 2007c; 55:632-637.
91. **Jeong HJ, Jeong JB, Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, de Lumen BO.** Lunasin is prevalent in barley and is bioavailable and bioactive in *in vivo* and *in vitro* studies. *Nutrition and cancer*, 2010, 62, 1113-1119.
92. **Jeong HJ, Lam Y, de Lumen BO.** Barley lunasin suppresses *ras*-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50, 5903-5908.

93. **Jeong HJ, Lee JR, Jeong JB, Park JH, Cheong YK, de Lumen BO.** The Cancer Preventive Seed Peptide Lunasin From Rye Is Bioavailable and Bioactive. *Nutrition and Cancer*, 2009; 61 (5): 680 -686.
94. **Jeong HJ, Park JH, Lam Y, de Lumen BO.** Characterization of lunasin isolated from soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51,7901-7906.
95. **Ji S, Orlikova B, Diederich M.** Non-Edible Plants as an Attractive Source of Compounds with Chemopreventive potential. *Journal Cancer Preview*, 2014, 19(1),1–6.
96. **Jones G, Srivastava A.** Understanding Lunasin's biology and potential as a cancer therapeutic by utilizing Drosophila genetics. *Experimental Biology Medicine (Maywood)*, 2014, 239(5),519-528. doi: 10.1177/1535370214522180.
97. **Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS, Wu AH, Gallaher RP, Wilkens LR, John EM, Howe GR, Dreon DM, West DW, Paffenbarger RS.** Vegetables, fruits, legumes, and prostate cancer: A multiethnic case- control study. *Cancer Epidemiological Biomarkers Preview*, 2000, 9, 795- 804.
98. **Koski SL.** Soy protein ingredients and their health benefits. *Agro food industry hi-tech*, 2006, 17, 33-35.
99. **Kohmoto K, Tsunasawa S, Sakiyama F.** Complete amino acid sequence of mouse prolactin *European Journal Biochemistry*, 1984, 138, 227-237.
100. **Koehn FE, Carter GT.** The evolving role of natural products indrug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4, 206–220.
101. **Krishnan HB, Wang TT.** An effective and simple procedure to isolate abundant quantities of biologically active chemopreventive Lunasin Protease Inhibitor Concentrate (LPIC) from soybean. *Food Chemistry*, 2015,177:120-126. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.006.
102. **Kwon KS, Park JH, Kim DS, Jeong JB, Sim YE, Kim MS, Lee HK, Chung GY. Jeong HJ.** .Antioxidant Activity and Identification of Lunasin Peptide as an Anticancer Peptide on Growing Period and Parts in Pepper. *Journal of Life Science*, 2005, 15, 528-535.

103. **Kyle S, Kier AR, McPherson MJ.** Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin *Microbial Cell Factories* 2012, **11**:28 doi:10.1186/1475-2859-11-28.
104. **Lam Y, Galvez A, de Lumen BO.** Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines. *Nutrition Cancer*, 2003, **47**, 88-94.
105. **Legzdina L., Nakurte I., Kirhnere I., Namniece J.,_Krigere L., Saleniece K., Beinarovica I., Muceniece R.** Up to 92 % increase of cancer-preventing lunasin in organic spring barley. *Agronomy for Sustainable Development*, 2014, **34** (4), 783-791.
106. **Legzdina L., Gaike M., Gaile Z., Bērziņa I.** Testing results of spring barley variety 'Rubiola'. *Agronomijas Vēstis* 2008, **11**, 94-101.
107. **Liu CF, Pan TM.** Recombinant expression of bioactive peptide lunasin in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2010, **88**(1), 177-186. doi: 10.1007/s00253-010-2754-5.
108. **Liu J, Jia SH, Kirberger M, Chen N.** Lunasin as a promising health-beneficial peptide. *European Review Medical Pharmacological Science*, 2014, **18**(14), 2070-2075.
109. **Losso JN.** The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk Inhibitor. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2008, **48**, 94-118.
110. **Lule VK, Garg S, Pophaly SD, Hitesh, Tomar SK.** Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. *Food Science*, 2015, **80**(3), R485-94. doi: 10.1111/1750-3841.12786.
111. **Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A.** Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal Food Science Nutrition*, 2003; **54**, 357-371.
112. **Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A.** Organic Food: Buying More Safety or Just Peace of Mind? A Critical Review of the Literature. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2006, **46** (1):, 23-56.
113. **Malaguti M, Dinelli G, Leoncini E, Bregola V, Bosi S, Cicero AFG, Hrelia S.** Bioactive Peptides in Cereals and Legumes: Agronomical, Biochemical and Clinical Aspects. *International Journal Molecular Science*, 2014, **15**, 21120-21135.
114. **Malumbres M, Barbacid M.** Timeline - RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer*, 2003, **3**, 459-465, ISSN 1474-175X.
115. **Manthey FA, Hareland GA, Huseby DJ.** Soluble and insoluble dietary fiber content and composition in oat. *Cereal Chemistry*, 1999, **76**, 417-420.

116. **Martinek P, Vinterova M, Buresova I, Vyhna T.** Agronomic and quality characteristics of triticale (X Triticosecale Wittmack) with HMW glutenin subunits 5p10. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47, 68e78.
117. **Matsui T, Li CH, Osajima Y.** Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *Journal Peptide Science* 1999, 5, 289–297. doi: 10.1002/(SICI)1099-1387(199907)5:7<289: AID-PSC196>3.0.CO;2-6.
118. **McConnell EJ, Devapatla B, Yaddanapudi K, Davis KR.** The soybean-derived peptide lunasin inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by suppressing phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncotarget.*, 2015, 6(7),4649-4662.
119. **McGoverin CM, Snyders F, Muller N, Botes W, Fox G, Manley M.** A review of **triticale** uses and the effect of growth environment on grain quality. *Journal Science Food Agriculture*, 2011, 91(7),1155-1165.
120. **Messina M, McCaskill-Stevens W, Lampe JW.** Addressing the soy and breast cancer relationship review, commentary and workshop proceedings. *Journal of National Cancer Institute*, 2006, 98, 1275-1284.
121. **Meyskens FL.** Development of Bowman-Birk inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. *Cancer Prevention Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001, 952, 116- 123.
122. **Mitchell RA, Lovegrove A, Shewry PR.** Lunasin in cereal seeds: What is the origin? *Journal Cereal Science*, 2013, 57(3), 267-269.
123. **Mishra BB, Tiwari VK.** Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46, 4769–47807.
124. **Montales MT, Simmen RC, Ferreira ES, Neves VA, Simmen FA.** Metformin and soybean-derived bioactive molecules attenuate the expansion of stem cell-like epithelial subpopulation and confer apoptotic sensitivity in human colon cancer cells. *Genes Nutrition*, 2015, 10(6):49. doi: 10.1007/s12263-015-0499-6.
125. **Murao N, Ishigai M, Yasuno H, Shimonaka Y. Aso Y.** Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2007, 21, 4033 – 4038.

126. **Muraki I, Rimm EB, Willett WC, Manson JE, Hu FB, Sun Q.** Potato Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: Results from Three Prospective Cohort Studies. *Cancer care*, 2015 Dec 17. pii: dc150547.
127. **Nakurte I, Klavins K, Kirhnere I, Namniece J, Adlere L, Matvejevs J, Kronberga A, Kokare A, Strazdina V, Legzdina L, Muceniece R.** Discovery of lunasin peptide in triticale (X Triticosecale Wittmack). *Journal of Cereal Science*, 2012, 56 (2), 510-514.
128. **Nakurte I, Kirhnere I, Namniece J, Saleniece K, Krigere L, Mekss P, Vicupe Z, Bleidere M, Legzdina L, Muceniece R.** Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L). *Journal of Cereal Science*, 2013, 57 (3), 319-324.
129. **Odani S, Koide T, Ono T, Seto Y, Tanaka T.** Soybean hydrophobic protein. Isolation, partial characterization and the complete primary structure. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 162, 485 – 491.
130. **Oita S, Ohnishi-Kameyama M, Nagata T.** Binding of Barley and Wheat α -Thionins to Polysaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2000, 64, (5), 958-964, DOI: 10.1271/bbb.64.958.
131. **Ortiz-Martinez M, Winkler R, Garcia-Lara S.** Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal Proteomics*, 2014, doi:10.1016/j.jprot.2014.03.044.
132. **Othman RA, Moghadasian MH, Jones PJ.** Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan. *Nutrition Reviews*, 2011, 69, 299-309. doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00401.x.
133. **Ozen AE, Pons, Tur JA.** Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 2012, 472-481.
134. **Pabona JM, Dave B, Su Y, Montales MT, de Lumen BO, de Mejia EG, Rahal OM, Simmen RC.** The soybean peptide lunasin promotes apoptosis of mammary epithelial cells via induction of tumor suppressor PTEN: similarities and distinct actions from soy isoflavone genistein. *Genes Nutrition*, 2013, 8(1), 79-90. doi: 10.1007/s12263-012-0307-5.
135. **Park JH, Jeong HJ, de Lumen BO.** Contents and bioactivities of lunasin, Bowman – Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 7686 – 7690.

136. **Park JH, Jeong JB, De Lumen BO, Jeong HJ.** The Anticancer Properties of Lunasin Peptide from Aged Callus Induced by the Soybean Tissue Culture. *Korean Journal of Plant Resources*, 2007a, 20, 518-523.
137. **Park JH, Lee JB, Kweon DH, Chung GY, Seo EW, de Lumen BO.** The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters*, 2007b, 255, 42-48.
138. **Pena RJ.** Food uses of triticale. In: Mergoum, M., Gomez-Mecpherson, H. (Eds.), Triticale Improvement and Production. FAO Plant production and Protection Paper No.179. *Food and Agriculture Organization of United Nations*, Rome, 2004, 37e48.
139. **Petrovska BB.** Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Reviews*, 2012 6(11), 1–5.
140. **Picchi V, Migliori C, Scalzo RL, Campanelli G, Ferrari V, Di Cesare LF.** Phytochemical content in organic and conventionally grown Italian cauliflower. *Food Chemistry*, 2012, 130, 501-509.
141. **Pratt DE.** Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. In M. G. Simic, & M. Karel (Eds.), *Autoxidation in food and biological systems*, 1980, 283–292.
142. **Riddle JM.** History as a tool in identifying "new" old drugs. *Advances Experimental Medicine Biology*, 2002, 505,89-94.
143. **Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, Gobbetti M.** Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutrition Cancer*, 2012, 64(1),111-120. doi: 10.1080/01635581.2012.630159.
144. **Ruberto G, Baratta MT.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*,2000, 69, 167–174.
145. **Ruoslahti E, Pierschbacher MD.** Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. *Cell*, 1986, 44, 517-518.
146. **Ruta J, Guillarme D, Rudaz S, Veuthey JL.** Comparison of columns packed with porous sub-2 µm particles and superficially porous sub-3 µm particles for peptides analysis at ambient and high temperature. *Journal of Separation Science*, 2010, 33, 2465–2477.

147. **Seber LE, Barnett BW, McConnell EJ, Hume SD, Cai J, Boles K, Davis KR.** Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. *PLoS One*. 2012;7(4):e35409. doi: 10.1371/journal.pone.0035409. Epub 2012 Apr 13.
148. **Setrerrahmane S, Zhang Y, Dai G, Lv J, Tan S.** Efficient production of native lunasin with correct N-terminal processing by using the pH-induced self-cleavable Ssp DnaB mini-intein system in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry Biotechnology*,. 2014, 174(2),612-622. doi: 10.1007/s12010-014-1081-1.
149. **Silva – Sanchez C, de la Rosa A PB, Leon – Galvan MF.** Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 1233 – 1240.
150. **Singh P, Bisetty K.** A molecular dynamics study of lunasin : research article. *South African Journal of Chemistry*, 2012, 65, 115-124.
151. **Sirtori CR1, Galli C, Anderson JW, Sirtori E, Arnoldi A.** Functional foods for dyslipidaemia and cardiovascular risk prevention. *Nutrition Research Reviews*, 2009, 22(2), 244-261. doi: 10.1017/S0954422409990187.
152. **Sloan AE.** The top 10 functional food trends: the next generation. *Food Technology*, 2002, 56, 32-58.
153. **Soares R, Franco C, Pires E, Ventosa M, Palhinhas R, Koci K, De Almeida MA, Coelho VA.** Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *Journal of Proteomics*, 2012, 75, 4190 - 4206.
154. **Spencer D, Higgins TJV.** Molecular Aspects of Seed Protein Biosynthesis. *In Commentaries in Plant Science*, 1981, 2, 175 – 189.
155. **Steuer AE, Poetzsch M, Koenig M, Tingelhoff E, Staeheli SN, Roemmelt AT, Kraemer T.** Comparison of conventional liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics in whole blood. *Journal Chromatography A*, 2015, 13, 1381:87-100. doi: 10.1016/j.chroma.2014.12.084. Epub 2015 Jan 8.
156. **Suetsuna K, Chen JR.** Isolation and characterization of peptides with antioxidant activity derived from wheat gluten. *Food Science and Technology Research*, 2002, 8(3), 227-230.

157. **Sun CL, Yuan JM, Arakawa K, Low SH, Lee HP, Yu MC.** Dietary soy and increased risk of bladder cancer: The Singapore Chinese health study. *Soybean and Health Epidemiological Biomarkers Preview*, 2002, 11, 1674-1677.
158. **Tamvakopoulos C.** Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26, 389 – 402.
159. **Tsai FH, Lien JC, Lin LW, Chen H., Ching HY, Wu CR.** Protective effect of *Broussonetia papyifera* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(9), 1933e1939.
160. **Tsvetkov M, Stoeva I.** Bread making quality of winter hexaploid triticale (X Triticosecale Wittmack) in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2003, 9, 203e208.
161. **Ulmus M, Johansson-Persson A, Krogh M, Olsson P, Onning G.** An oat bran meal influences blood insulin levels and related gene sets in peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects. *Genes Nutrition*, 2011, 6, 429-439.
162. **Van de Vijver LP, Van den Bosch LM,, Van den Brandt PA.** Whole-grain consumption, dietary fibre intake and body mass index in the Netherlands cohort study. *European Journal Clinical Nutrition*, 2009, 63, 31–38.
163. **Verpoorte R.** Pharmacognosy in the New Millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2000, 52, 253–262.
164. **Wang W, Dia VP, Vasconez M, Nelson RL, Gonzalez de Mejia E.** Analysis of soybean protein-derived peptides and the effect of cultivar, environmental conditions, and processing on lunasin concentration in soybean and soy products. *Journal of AOAC International*, 2008, 91, 936-946.
165. **Wang H, Murphy P.** Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42, 1666-1673.
166. **Wong RH, Howe PR, Coates AM, Buckley JD, Berry NM.** Chronic consumption of a wild green oat extract (*Neuravena*) improves brachial flow-mediated dilatation and cerebrovascular responsiveness in older adults. *Journal Hypertension*, 2013, 31(1),192-200.

167. **Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL, Nomura AMY, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Hoover RN, Pike MC.** Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiological Biomarkers Preview*, 1996, 5, 901-906.
168. **Xi L, Jin Y, Parker E, Josh P, Jones A, Wijffels G, Colgrave ML.** Challenges in Mass Spectrometry- Based Quantification of Bioactive Peptides: A Case study Exploring the Neuropeptide Y Family. *Peptide Science*, 2012, 98, 357-366.
169. **Yin H, Pan X, Song Z, Wang S, Sun G.** Protective Effect of Wheat Peptides against Indomethacin-Induced Oxidative Stress in IEC-6 Cells. *Nutrients* 2014, 6, 564-574; doi:10.3390/nu6020564.
170. **Yuliana ND, Khatib A, Choi YH, Verpoorte R.** Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research*, 2011, 25, 157–169.
171. **Zambrowicz A, Timmer M, Polanowski A, Lubec G, Trziszka T.** Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 2013, 44, 315–320.
172. **Zheng W, Dai Q, Custer LJ, Shu XO, Wen WQ, Jin F, Franke AA.** Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 1999, 8, 35-40.