

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS PROGRAMMA

***Vaccinium spp.* ogu ekstraktu polifenolu saturs un
antioksidatīvie efekti**

MAĢISTRA DARBS

Autors: Reinis Rembergs

Studentu apliecības nr.:rr16048

Darba vadītājs: Dr.habil.biol. Ruta Muceniece

Rīga, 2018

KOPSAVILKUMS

Brīvie radikāļi ķermenī rada oksidatīvo stresu un deģeneratīvus procesus, kuru rezultātā var tikt bojāti veselie audi un izraisīta šūnu nāve. Atklājumi par brīvo radikāļu negatīvo ietekmi uz šūnām un saistību ar dažādu slimību progresēšanu, piemēram, vēža, aknu cirozes, artrīta, aterosklerozes, sirds un asinsvadu slimību, neirodeģeneratīvo traucējumu, kā arī ievērojams skaits epidemioloģisko pētījumu par saslimšanas riska samazināšanos, lietojot uzturā ar antioksidantiem bagātus produktus, ļauj domāt par jaunu pavērsienu medicīnas zinātnē.

Darba mērķis: Izpētīt melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu spiedatlieku ekstraktu antioksidatīvās īpašības un atrast to saistību ar ekstraktu polifenolu saturu.

Iegūtie rezultāti liecina, ka ogu ekstraktiem ir atšķirīgi polifenolu līmeņi un attiecīgi dažāda stipruma antioksidatīvās īpašības.

Atslēgas vārdi: Antioksidanti, polifenoli, *Vaccinium spp.* ogu ekstrakti.

SUMMARY

Free radicals in the body produce oxidative stress and degenerative processes, which can damage healthy tissues and cause cell death. Reveals of the negative effects of free radicals on cells and the association with the progression of various diseases, such as cancer, cirrhosis of the liver, arthritis, atherosclerosis, cardiovascular disease, neurodegenerative disorders, as well as a significant number of epidemiological studies on the reduction of the risks of diseases by using diet rich in antioxidants products, lets think about a new milestone in medical science.

Aim of the work was to investigate the antioxidant properties of extracts of blueberries, highbush blueberries, large cranberries, cranberries and lingonberries and to find their association with the content of extract polyphenols.

The obtained results indicate that the berry extracts have different levels of polyphenols and, accordingly, antioxidant properties of different strengths.

Keywords: Antioxidants, polyphenols, *Vaccinium spp.* berry extracts.

SATURA RĀDĪTĀJS

KOPSAVILKUMS.....	2
SUMMARY	3
SATURA RĀDĪTĀJS	4
IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1 OKSIDATĪVAIS STRESS	7
1.1.1 Neenzimātiski avoti	7
1.1.2 Enzimātiski avoti	8
1.2. BRĪVIE RADIKĀĻI.....	9
1.2.1 Reaktīvo skābekļa sugu līmeņu mērīšana	11
1.2.2 Superoksīds.....	13
1.3. ANTIOKSIDANTI.....	14
1.3.1. Antoksidantu veidi.....	17
1.3.2. Antioksidantu funkcijas.....	19
1.4. <i>VACCINIUM SPP.</i> OGAS.....	25
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	27
2.1. Materiāli	27
2.1.1 Reaģenti, palīgvielas un materiāli	27
2.1.2. Aparatūra	28
2.2. Metodes	28
2.2.1 Totālo polifenolu satura mērīšana	28
2.2.2 Totālo flavonoīdu satura mērīšana.....	29
2.2.3 DPPH brīvā radikāļa koncentrācijas mērīšana.....	29
2.2.4 Totālās antioksidantu aktivitātes mērīšana	29
2.2.5 Superoksīda dismutāzes aktivitātes mērīšana	30
3. REZULTĀTI.....	32
3.1. Totālais polifenolu saturs.....	32
3.2. Totālais flavonoīdu saturs.....	34
3.3. DPPH.....	36
3.4. Totālā antioksidantu aktivitāte.....	38
3.5. SOD aktivitāte	39
4. DISKUSIJA.....	41
5. SECINĀJUMI	45
6. PATEICĪBAS	46
7. LITERATŪRAS SARAKSTS	47

IEVADS

Oksidācijas process organismiem ir nepieciešams, lai gūtu enerģiju, kas nepieciešama bioloģiskajiem procesiem. Brīvo radikāļu izraisītajās oksidēšanas reakcijās ir iesaistīts slāpekļis vai skābeklis un elektronu transports. Pēc nepilnīgas šo molekulu reducēšanās veidojas brīvo radikāļu molekulas, kuras kopumā apzīmē par reaktīvajām skābekļa sugām. Tās piedalās normālos fizioloģiskos dzīvības procesos, piemēram, šūnu proliferācijā, makrofāgu darbībā, bet tās pastiprināti veidojas daudzu pataloģiju iedarbību un ārējās vides izmaiņu rezultātā. Šūnām ir sava brīvo radikāļu neitralizēšanas sistēma, ar kuras palīdzību gan pašus brīvos radikāļus, gan arī to izraisītās oksidēšanas reakcijas tiek uzturētas nepieciešamajā normas līmenī. Oksidatīvais stress veidojas, ja tiek izjaukts līdzsvars starp brīvo radikāļu produkciju un to neitralizēšanu [Yang et al., 2002].

Brīvie radikāļi ķermenī rada deģeneratīvu procesu, kura rezultātā var tikt bojāti veselie audi un izraisīta šūnu nāve. Atklājumi par brīvo radikāļu lomu dažādu slimību progresēšanā, piemēram, vēža, aknu cirozes, neurodeģeneratīvajiem traucējumu, aterosklerozes, sirds un asinsvadu slimību, artrīta, novecošanās un citu procesu attīstībā, kā arī ievērojams skaits epidemioloģisko pētījumu par saslimšanas riska samazināšanos, lietojot uzturā ar antioksidantiem bagātus produktus, ļauj domāt par jaunu pavērsienu medicīnas zinātnē. [Halliwell et al., 2003].

Vaccinium sugas ogu ekstrakti ir perspektīvi, lai tos izmantotu modernajā medicīnā, piemēram, ārstējot dažādas slimības vai izmantojot tos slimību profilaksē to dažādo īpašību dēļ. Ekstraktiem piemīt antioksidatīvās, pretiekaisuma, antidiabētiskās, antimikrobiālās, diurētiskās un daudzas citas īpašības. Ogu ekstraktu ķīmiskais sastāvs ir ļoti sarežģīts un augšanas apstākļi – kultivētas vai savvaļas ogas – var ietekmēt ekstraktu veselībai svarīgo potenci. Tādēļ nepieciešami padziļināti pētījumi gan ar kultivētām, gan ar savvaļas ogām, lai nākotnē būtu iespējams izveidot kādu nozīmīgu farmaceitisku produktu.

Hipotēze: Ogu ekstraktiem piemīt antioksidatīvās īpašības, kuru intensitāte atšķiras ekstraktu sastāva dēļ.

Darba mērķis: Izpētīt melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu spiedatlieku ekstraktu antioksidatīvās īpašības un atrast to saistību ar ekstraktu polifenolu saturu.

Darba uzdevumi:

- izmērīt flavonoīdu un polifenolu daudzumu piecu *Vaccinium spp.* ogu izspiedņu ekstraktos;

- pētīt šo ekstraktu antioksidantu efektus totālo antioksidantu spējas, brīvā 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikāļa un superoksīda anjona līmeņa mērīšanas in vitro testos;
- salīdzināt ogu spiedatlīeku ekstraktu polifenolu un flavonoīdu saturu ar atbilstošo ogu ekstraktu antioksidatīvo efektivitāti un noskaidrot, vai polifenolu satura atšķirības ietekmē antioksidatīvās īpašības.

Maģistra darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē Dabaszinātņu akadēmiskā centra zinātniskajā laboratorijā Dr. habil. biol. Rutas Mucenieces vadībā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1 OKSIDATĪVAIS STRESS

Oksidatīvais process, kas regulāri noris šūnās, ir nepieciešams šūnas dzīvībai un nāvei. Galvenie punkti:

- molekulārajam skābeklim ir spēja radīt brīvos radikāļus, kuri ir nestabili;
- šie brīvie radikāļi ir ļoti reaktīvi un izraisa reaktīvo skābekļa sugu (ROS) veidošanos;
- nepieciešams vairākām bioloģiskām funkcijām, kā apoptoze, nekroze, fagocitoze, kuras kontrolē ROS;
- reaktīvos metabolītus selektīvi neitralizē ķermeņa aizsardzības mehānismi;
- principiālie aizsardzības mehānismi ir antioksidantu enzīmi un endogēnie antioksidanti;
- šūnā tiek izveidots līdzsvars starp prooksidantiem un antioksidantiem, izmaiņas līdzsvarā izraisa kaitīgus efektus šūnas dzīvē;
- palielināts antioksidantu līmenis var traucēt normālam oksidatīvam procesam;
- samazināts antioksidantu līmenis ļauj veidoties reaktīvajiem metabolītiem.

Ir zināms, ka molekulārā skābekļa nesapārots elektrons reaģē, veidojot ROS. ROS tiek veidots gan no enzimatiskiem, gan neenzimatiskiem avotiem [Orient et. al., 2007].

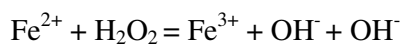
1.1.1 Neenzimātiski avoti

Fentona un Habera reakcijas: Halliwell un Gutteridge izskaidro molekulārā skābekļa redukciju, lai izveidotu superoksīda anjonu. Šiem superoksīda anjoniem piemīt spēja veidot vairāk un aktīvākus ROS. Superoksīdu dismutācija veido ūdeņraža peroksīdu.

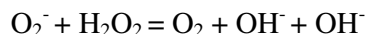


H_2O_2 , ūdeņraža peroksīds, ir stabilāks kā O_2^- superoksīds. Tas tiek cauri plazmas membrānai un tam ir divas svarīgas lomas ķermenī. Vai nu to neitralizē katalāze/GSH (glutaciona peroksidāze), vai tā palīdz veidot ROS [Halliwell et. al., 1989].

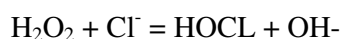
Fentona reakcijā ūdeņraža peroksīdi reaģē ar dzelzi vai varu, lai izveidotu augsti reaģējošus hidroksiljonus, OH.



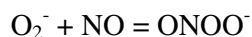
Haber-Weiss reakcijā



H_2O_2 reaģē ar Cl^- , Br^- , I^- un to utilizē mieloperoksidāze, lai izveidotu vairāk reaktīvus hiperhlorskābes/hiperhlorītus. Šī reakcija ir svarīga proteīnu agregācijai un fermentācijai [Babior, 2000].



Peroksinitrīta veidošanās ir primārā reakcija.



1.1.2 Enzimātiski avoti

ROS veido skābekļa metabolisms, tiem ir nesapārots elektrons, kas paliek ļoti reaktīvs. To producē visi aerobie organismi, kuri veic celulāro metabolismu. ROS enzimātiskie avoti subcelulārā līmenī ir ksantīna oksidāze, ciklooksigenāze (COX) un lipoksigenāze (LOX), NO sintāze (nitric oxide synthase) un mitohondriālās oksidāzes [Lambeth, 2004].

1) Monoamīnu oksidāze

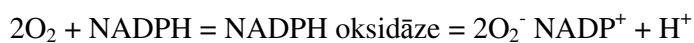
Fizioloģiskos apstākļos mitohondriju membrānā elektronu transporta ķēde veido adenozintrifosfātu (ATF) un O_2^- . Hēma grupu saturošais enzīms monoamīna oksidāze, kas atrodama ārējā mitohondriālajā membrānā, katalizē oksidatīvo amīnu deamināciju, tādejādi veidojot H_2O_2 matricā un citosolā [Cadenas et. al., 2000].

NADPH oksidāze/ elpošanas pārslodzes oksidāze:

Fagocītu NADPH oksidāzei ir svarīga loma saimnieka aizsardzībā pret invazīviem mikrobiem, veidojot superoksīdus. Tā ir atrodama neitrofilos un veido O_2^- . Fagocītu NADPH oksidāze ir multikompleksu enzīms, kas atrodams plasmā membrānā aktivētā šūnā. Tā satur vairākas komponentes, ieskaitot citohromu p47, p67, p40 un rac 1 (monocīti)/rac 2 (neitrofīli). NADPH oksidāze ir piestiprināta celulārajai membrānai. Saņemot stimulāciju, citoplazmiskās subvienības aktivē to un izraisa elpošanas pārslodzi, kas aktivē superoksīdus un atbrīvo tos fagosomās [El-Benna et. al., 2005].

Tādā pašā manierē arī endotēlijs, fibroblasti, mezenhimālās šūnas, osteoklasti, hondrocīti un gludā muskulatūra veido superoksīdus. NADPH-līdzīgās oksidāzes aktivē hormoni un citokīni. Tās darbojas ne tikai kā aizsargmehānisms, bet arī kā signāls [Kerr et. al., 1999].

ROS veido monovalentā skābekļa redukcija.



2) **Ksantīna oksidoreduktāze**

Ksantīna oksidoreduktāze (XOR) katalizē hipoksantīnu ksantīnā un tālāk urīnskābē. Ksantīna oksidoreduktāze un ksantīna dehidrogenāze (XD) ir divas transformētas ksantīna formas. XD transformējas par XO bez atpakaļceļa un to veic proteolīze un sulfhidrilu oksidācija, kas veido lielu apjomu H_2O_2 un O_2^- . Ir novērots, ka XOR piemīt spēja pārveidot nitrātus nitrītos un NO. Tā arī katalizē reakciju ar NO un O_2^- , kas veido augsti reaģējošus peroksinitrītus [Vorbach et. al., 2003].

3) **Arahidonskābe**

Arahidonskābes metabolisma laikā ROS veidojas iekššūnās, tās metabolismā ir iesaistīta ciklooksigenāze, lipoksigenāze, citohroma P450 oksidāzes enzīmu sistēmas [Ivanov et. al. 2005].

4) **Citohroma P450 oksidāze**

Citohroma P450 oksidāze ir hēmu saturošs enzīms, kas ir atrodams mitohondrijos un piedalās holesterīna, steroīdu un hormonu metabolismā, kuņģa skābes, arahidonskābes un eikosanoīdu katabolismā, kā arī vitamīna D3 hidroksilēšanā. Tas pārvieto $2e^-$; viens ir piesaistīts skābeklim un otrs tiek reducēts ūdenī. Daļa no oksīda reducējas superoksīdos [Omura, 1999].

5) **Mieloperoksidāze**

Hēmu saturošs enzīms, kurš atrodams neitrofilos un eozinofilos, katalizē H_2O_2 ar dažādiem substrātiem, lai izveidotu augsti reaģējošas hipohlorskābes [Klebanoff, 2005].

1.2. BRĪVIE RADIKĀĻI

Reaktīvās skābekļa sugas jau sen ir zināmas kā sastāvdaļa imūno šūnu spējai nogalināt mikrobus invāzijas gadījumā. Nesenie pētījumi parādīja, ka ROS spēlē galveno lomu kā kurjers normālā šūnu signāla pārraidē un šūnu ciklā. Šīs reaktīvās molekulas veido dažādi mehānismi un tos var noteikt ar dažādām metodēm.

Reaktīvā skābekļa suga ir termins, ko izmanto, lai aprakstītu reaktīvo molekulu un brīvo radikāļu spektru, kas radies no molekulārā skābekļa. Skābekļa radikāļu produkti ir posts visām aerobajām sugām. Šīm molekulām, kas veidojušās kā starpprodukti mitohondriju elektronu transporta aerobās elpošanas laikā vai oksidoreduktāzes enzīmu un metālu katalizētās oksidācijas reakcijās, piemīt potenciāls radīt vairākus šūnai kaitīgus faktoros. Agrāk tika uzskatīts, ka tikai fagocītu šūnas ir atbildīgas par ROS veidošanos, jo tie ir saistīti ar saimniekorganismu šūnu aizsardzības mehānismiem. Jaunākie pētījumi pierāda, ka ROS ir loma šūnu signalizēšanā, ieskaitot apoptozi, gēnu ekspresiju un šūnu signālkaskādes aktivizēšanu. Jāatzīmē, ka ROS var kalpot gan kā iekšējo, gan starpšūnu signālu pārnēsētājs [Hancock et. al., 2001]. Vairākums ROS tiek radīts kā starpprodukts mitohondriālajā elektronu transportā. Papildus ROS tiek izveidoti arī nepieciešamie starpprodukti metālu katalizētu oksidācijas reakcijām. Skābekļa sastāvā ir divi nesaistīti elektroni atsevišķās orbītās ārējā elektronu apvalkā. Šī elektronu struktūra padara skābekli jutīgu pret radikāļu veidošanos. Sekojošais skābekļa samazinājums caur elektronu pievienošanos noved pie vairāku ROS veidošanās, piemēram, superoksīda, ūdeņraža peroksīda, hidroksil radikāļiem, hidroksil joniem un slāpekļa oksīda.

ROS detoksikācija ir vissvarīgākā visu aerobo dzīvības formu izdzīvošanai. Tādēļ liels skaits aizsardzības mehānismu ir izveidojušies, lai apmierinātu šo vajadzību un nodrošinātu līdzsvaru starp ROS ražošanu un neitralizēšanu. Disbalansu pret prooksidatīvo stāvokli bieži sauc par oksidatīvo stresu. Šūnām ir dažādi aizsardzības mehānismi, lai izlabotu ROS kaitīgos efektus. Superoksīda dismutāze (SOD) katalizē divu superoksīdu anjonu pārvēršanu ūdeņraža peroksīda un skābekļa molekulās [Jones, 2000].

Šūnām vairojoties, tās iziet cauri koordinētam procesam – šūnu augšana, DNS duplikācija un mitoze, kas tiek dēvēts arī par šūnu ciklu. Šūnu cikls ir cieši regulēts process ar vairākiem kontrolpunktiem. Katru no šiem kontrolpunktiem regulē proteīni vai proteīnu kompleksi, kurus ietekmē šūnas oksidatīvais stāvoklis [Burhans et. al., 2009].

Vairums šūnu dzīvniekos nevairojas un īslaicīgi vai pastāvīgi ir izslēgtas no šūnu cikla ar terminālo diferenciaciju. G_0 izeja un ieeja G_1 , kā atbilde ekstracelulārajiem augšanas faktoriem, ir antioksidantu kontrolēta. Reducēšanās-oksidēšanās atkarīgie signālu ceļi veicina ciklīna D1 ekspresiju, kas ir atslēg-proteīns atkārtotas darbības šūnu ciklā. Ir ziņots, ka ciklīna D1 ekspresija ir izdevušās mitogēnas stimulācijas marķieris. Svarīgs regulatorais punkts G_1 fāzē ir restrikcijas punkts jeb R punkts, kad šūnas sāk savu ceļu S-fāzē. R punktā, retinoblastoma (pRb) proteīns tiek fosforilēts ar ciklīn D un CDK kompleksu palīdzību [Latella et. al., 2001].

Reaktīvā skābekļa sugām ir loma apoptozē. NF-kappaB, kas ir kodoltranskripcijas faktors - termins ar kuru apzīmē Rel transkripcijas faktorus, inhibē apoptozi, regulējot vairākus antiapoptotiskos gēnus. Pretēji, ilgstošu laika periodu aktivēta c-Jun N-terminālkināze (JNK) veicina apoptozi. Ir ziņots, ka ilgstošu aktivitāti izraisa ROS tiešā iedarbība, kā arī traucējot JNK inhibitoru, piemēram, MAP kināzes fosfatāzes darbību. TNF- α -inducētu ROS akumulācijas supresija varētu būt mehānisms, ar kuru NF- κ B apspiež JNK aktivāciju [Burch et. al., 2005].

1.2.1 Reaktīvo skābekļa sugu līmeņu mērīšana

Reaktīvo skābekļa sugu līmeņu vai daudzumu mērīšana ir atkarīga no analītiskā mērķa, kā arī interesējošās reaktīvā skābekļa sugas. Šūnu līmenī specifiskā ROS var tikt noteikta šūnu kultūrās, kamēr in vivo dzīvnieku līmenī tipiski oksidatīvā stresa efekti tiek mērīti asinīs (serumā vai plazmā) vai urīnā.

Glutathions ir svarīgākais neenzimātiskais oksidantu aizsardzības mehānisms. Tas eksistē relatīvi lielos daudzumos (mM līmeņos) un kalpo, lai detoksicētu peroksīdus un reģenerētu lielu skaitu svarīgu antioksidantu, piemēram, α -tokoferolu un askorbīnskābi [Tarpley et. al. 2004]. Reducēts glutathions (turpmāk arī – GSH) tiek reģenerēts no tā oksidētās formas (turpmāk arī – GSSG) ar NADPH atkarīgās reduktāzes palīdzību.



Ņemot vērā GSSG straujo reducēšanos dabu, salīdzinot ar tā sintēzi vai sekrēciju, GSH un GSSG proporcija ir labs oksidatīvā stresa indikators šūnās. GSH un GSSG līmeņus var noteikt ar augstefektīvo šķidrums hromatogrāfiju (turpmāk arī – HPLC), kapilāro elektroforēzi vai mikroplatēs ar bioķīmiskām reakcijām.

Lai izmērītu glutathiona daudzumu paraugos, ir izstrādātas dažādas testa metodes. Izmantojot luciferīna derivātu savienojumā ar glutathiona S-transferāzes enzīmu, GSH daudzums būtu proporcionāls luminiscējošajam signālam, kas rodas pēc luciferāzes pievienošanas. Totālo glutathiona daudzumu var izmērīt ar kolorimetrisku metodi, jo GSH reaģējot ar DTNB (Ellmana reaģents) glutathiona reduktāzes klātbūtnē rodas krāsains savienojums. Glutathiona reduktāze reducē GSSG uz GSH, kas tālāk reaģē ar DTNB, un rodas dzeltenīgas krāsas 5-thio-2-nitrobenzoscābe (TNB), kuras absorbciju mēra pie 412 nm [Camera et al., 2002].

GSH daudzuma un lokalizācijas noteikšana ir svarīga šūnu reducēšanās-oksidēšanās statusa modulācijas, zāļu darbības un detoksifikācijas mehānismu izpratnei. Turklāt novērotas atšķirības GSH līmenī, reaģējot uz oksidatīvo stresu šūnu subpopulācijās, kas

pasvītro GSH līmeņa mērīšanas metožu svarīgumu. Jāizvēlas mērīšanas metodes, kas ir piemērotas plūsmas citometrijai un automatizētai fluorescences detektēšanai.

Bimani savienojumi monobromobimāns un monohlorobimāns ir praktiski nefluorescējoši savienojumi līdz brīdim, kad tiek konjugēti, reaģējot ar mazmolekulāriem tioliem, ieskaitot glutationu. Tad izveidojas fluorescējošs adukts ar ierosinājuma viļņa garumu 394 nm un emisiju pie 490 nm. Šie reaģenti ir noderīgi proteīnu tiolu izplatības noteikšanai šūnās pirms un pēc disulfīdu ķīmiskās reducēšanas. Monohlorbimāns, kas ir vairāk tielselektīvs kā monobromobimāns, jau ilgi tiek izmantots kā tiolu reaktīvā zonde, lai kvantificētu glutaciona līmeni šūnās un mērītu GST aktivitāti. Zili fluorescējošais glutaciona un monohlorbimāna adukts uzkrājas šūnas kodolā, tādēļ tas nav uzticams indikators kodola un citoplasmiskai glutaciona lokalizācijas pētījumiem [Briviba et al., 1993].

Lipīdu peroksidācija ir viens no plašāk pielietotajiem indikatoriem, lai noteiktu brīvo radikāļu veidošanos, kas ir svarīgs oksidatīvā stresa indikators. Nepiesātinātas taukskābes, piemēram, tās, kas atrodas šūnu membrānās, ir parastais brīvo radikāļu mērķis. Reakcijas parasti notiek kā ķēdes reakcija, kur brīvais radikālis uztvers ūdeņraža daļu no nepiesātinātā oglekļa, veidojot ūdeni. Process izveido nesapārotu elektronu taukskābē, kas ir spējīgs uztvert skābekli, izveidojot peroksīda radikāli. Lipīdu peroksīdi ir nestabili un sadalās, lai veidotu kompleksu savienojumu virkni. Vēsturiski lipīdu peroksidācijas konstatēšana balstās uz tiobarbiturātskābes (turpmāk arī – TBA) reaktīvo savienojumu, piemēram, malondialdehīda (turpmāk arī – MDA), kas veidojas sadaloties lipīdu peroksidācijas produktiem, līmeņa mērīšanu. Kaut arī šī metode ir pretrunīga, tā ir diezgan jutīga, bet ne obligāti specifiska. Tomēr MDA līmeņa mērīšana joprojām ir visplašāk izmantotais līdzeklis, lai noteiktu lipīdu peroksidāciju. Šī reakcija noris skābā vidē 90-100 grādos pēc Celsija, izveidojas adukts ar krāsu, kuras absorbciju var nomērīt kolorimetriski 532 nm vai mērīt tā fluorescenci pie ierosinošā 530 nm viļņa un 550nm emisijas viļņa. Vairāki komerciāli testu komplekti (kiti) ir pieejami, izmantojot šīs metodes [Pryor et. al., 1976].

Pierādīts, ka arahidonskābes F2 formas prostanīda derivātu, ko sauc par F2-izoprostantiem (IsoP), veidošanās ir raksturīga lipīdu peroksidācijai. Atšķirībā no TBA testa, IsoP mērījumi ir specifiski lipīdu peroksīdiem, tie ir stabili un tie nerodas enzimatiskā ceļā, kas padara noteikšanu vieglāku [Morrow et. al., 1990]. IsoP daudzumu var mērīt ar dažādiem ELISA kitiem, bet paraugos esošās citas vielas prasa daļēju paraugu attīrīšanu pirms mērījumu veikšanas. Tas nozīmē, ka efektīvāka detektēšanas metode ir

gāzes hromatogrāfija/masspektrometrija (GC/MS), kas sadārdzina un ierobežo eksperimentu caurlaidspēju [Roberts et. al., 2000].

Lipīdu peroksidāciju dzīvās šūnās var novērot, izmantojot fluorescentus derivātus, kuri lokalizējas membrānās. Piemēram, undekanoīnskābes fluorofora polinepiesātināta butadienildaļas oksidācija izmaina fluorescences emisijas viļņu garumu no 590nm uz 510nm [Pap et. al., 2000].

1.2.2 Superoksīds

Superoksīda līmeņa mērīšana ir balstīta uz superoksīda reakciju ar kādu citu savienojumu, lai rastos izmērāms produkts. Ferricitohroma c reducēšana ir izmantota vairākās situācijās, lai novērtētu superoksīda veidošanās ātrumu. Kaut arī tā nav pilnībā specifiska superoksīdam, šo reakciju var novērtēt kolorimetriski pie absorbcijas 550nm. Pievienojot enzīmu inhibitorus CN- vai ROS neitralizētājus, kā katalāzi, ir iespējams minimizēt reoksidāciju. Akonitāze katalizē citrāta pārveidošanu par izocitrātu. Superoksīds inaktivē šo enzīmu oksidējot Fe(II) daļu no tā kubāna (4Fe-4S) klastera. Tādejādi, superoksīda koncentrāciju var aprēķināt pēc enzīma inaktivācijas pakāpes. Enzīma aktivitāti var novērot pēc 20mM izocitrāta pārveidošanās par cic-akonitātu pie absorbcijas 240nm. Tests, kurā akonitāzes produkts – izocitrāts – tiek pārveidots par α -ketoglutarātu NADP+ atkarīgās izocitrāta dehidrogenāzes dēļ, arī var tikt izmantots. Šajā reakcijā NADPH produkciju var novērot kolorimetriski pie absorbcijas 340nm [Tarpley et. al., 2004].

Hemiluminiscences reakcijas arī ir izmantotas, jo tām ir labāka potenciālā jutība par absorbcijas-bāzētas detekcijas metodēm. Visplašāk izmantotais substrāts ir lucigenīns, bet šim savienojumam ir tendence oksidēt-reducēt, kas ir radījis šaubas par tā izmantošanu superoksīda ražošanas ātruma un daudzuma mērīšanai. Viens ierosinājums ir tāds, ka šis savienojums ir jāizmanto mazākās koncentrācijās, kas varētu minimizēt šo problēmu [Tarpley et. al., 2001].

Hidrociānīnu krāsas ir superoksīda un hidroksil- radikāļu fluorogēni sensori. Šīs krāsvielas sintezē, reducējot cianīna krāsvielu molekulas iminija katjonu ar nātrija borohidrātu. Kaut arī tās ir vāji fluorescenti, oksidējoties to fluorescences intensitāte palielinās simtkārtīgi. Papildus fluorescējošām īpašībām oksidācija arī pārveido molekulu no membrānu caurejošas pret jonu necaurlaidīgu daļu. Raksturīgākās zondes ir HydroCy3 un HydroCy5 [Kundu et. al., 2009].

Superoksīda veidošanās šūnā var tikt vizualizēta ar dihidroetīdiju, ko dēvē arī par hidroetīdīnu. Šis savienojums, ja tiek oksidēts ar superoksīda vai kāda cita reaktīvā skābekļa vai slāpekļa sugas palīdzību, fluorescē zilā krāsā citosolā. Oksidējot dihidroetīdiju notiek hidroksilācija otrajā pozīcijā, izveidojot 2-hidroksietīdiju. Ar oksidēšanu savienojums tiek iestarpināts šūnu DNS, nokrāsojot kodolu spilgti fluorescējoši sarkanu. Fluorescenci mēra ar ierosmes un emisijas viļņiem attiecīgi pie 535nm un 635nm [Zielonk et. al., 2008].

1.3. ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti ir cilvēka radītas vai dabiskas vielas, kas var novērst vai aizkavēt dažādu veidu šūnu bojājumus. Antioksidanti ir atrodami daudzos pārtikas produktos, ieskaitot augļus un dārzeņus. Kaut arī oksidācijas reakcijas ir neaizvietojami svarīgas dzīvībai, tās var arī kaitēt. Augos un dzīvniekos ir sarežģītas sistēmas ar vairāku tipu antioksidantiem, piemēram, glutations, C vitamīns, A vitamīns un E vitamīns, kā arī tādi enzīmi kā katalāze, superoksīda dismutāze un dažādas peroksidāzes. Tradicionālie augu izcelsmes medikamenti, diētiskie pārtikas produkti bija galvenais antioksidantu avots senajām tautām un aizsargāja šūnas no brīvo radikāļu nodarītajiem kaitējumiem. Antioksidanti tiek plaši izmantoti uztura bagātinātājos un ir pētīti, lai novērstu tādas slimības kā vēzis, koronāro sirds slimību un pat vertigo. Kaut arī sākotnējie pētījumi liecināja, ka antioksidējošie uztura bagātinātāji var veicināt veselību, vēlāk liela apjoma uztura bagātinātāju ar beta-karotīnu, A vitamīnu un E vitamīnu atsevišķi vai dažādās kombinācijās klīniskie pētījumi liecināja, ka tiem nav ietekmes uz cilvēku mirstību vai, iespējams, pat palielina to. Antioksidantus izmanto arī pārtikas rūpniecībā kā pārtikas konservantus, kosmētikā un lai novērstu gumijas un benzīna degradāciju [Boxin et al, 2002].

Tiek uzskatīts, ka antioksidanti ir ļoti nozīmīgi ķermeņa aizsardzības sistēmā pret ROS. Citos terminos izsakoties antioksidants ir “jebkura viela, kas, ja tā ir zemā koncentrācijā, salīdzinot ar oksidējamo substrātu, būtiski aizkavē vai inhibē šī substrāta oksidēšanu” [Halliwell et. al., 1995]. 2007. gadā pētnieki ziņoja, ka antioksidants ir “jebkura viela, kas aizkavē, novērš vai likvidē oksidatīvo bojājumu mērķa molekulai”. Antioksidants ir oksidācijas procesa inhibitors pat relatīvi nelielā koncentrācijā un tādejādi tam piemīt dažāda fizioloģiskā loma ķermenī. Augu materiāla antioksidējošās sastāvdaļas darbojas kā brīvo radikāļu savācēji un palīdz tos pārveidot uz mazāk reaģējošu

ROS. Daudz un dažādi brīvo radikāļu savācēji ir atrodami dažādos pārtikas produktos, piemēram, augļos, dārzeņos, tējā, utt. Antioksidanti ir mūsu pirmā aizsardzība pret brīvo radikāļu izraisītajiem bojājumiem un ir vitāli svarīgi, lai saglabātu normālu veselības stāvokli un pašsajūtu. Regulāra dārzeņu un augļu, kuri satur antioksidantus, patērēšana ir saistīta ar samazinātu hronisku slimību risku [Dembinska-Kiec et. al., 2008]. Vairāki pētījumi ziņo, ka ar antioksidantiem bagātai diētai piemīt ļoti pozitīva ietekme uz veselību [Sin et. al., 2013]. Labi zināms ir fakts, ka citrusaugļi (apelsīni, citroni, utt.) satur lielu daudzumu dabisko antioksidantu, piemēram, C vitamīnu. Mellenēs, zemenēs, vīnogās, plūmēs, spinātos, kāļos, brokoļos, lucernā, kāpostos un daudzos citos augos ir pierādīts liels daudzums antioksidantu. Nesenie pētījumi arī liecina par to, ka, piemēram, Indijas maizeskoka auglis džefrūts, ir labs vitamīna C un fenola savienojumu avots [Pereira et. al., 2013]. Papildus šim visam, notiek arī pētījumi, kuros tiek noskaidrotas nepieciešamās ģenētiskās, ķīmiskās vai bioloģiskās modifikācijas, kas nepieciešamas, lai palielinātu augļu antioksidantu potenci [Gomes et. al., 2013].

Mūsdienās pārtikā ir atrasti vairāki dažādi antioksidanti, dabiskie antioksidanti, sintētiskie antioksidanti, diētiskie antioksidanti, endogēnie antioksidanti, kuriem ir liela nozīme ēdienu kvalitātes saglabāšanā.

Antioksidanti ir atrodami pārtikā kā vitamīni, minerāli, karotenoīdi un polifenoli, neskaitot citus. Dabīgajiem antioksidantiem, sintētiskajiem antioksidantiem un uztura antioksidantiem ir svarīga loma mūsu ķermenī. Galvenā antioksidantu funkcija ir oksidācijas prevencija dažādās situācijās. Cilvēka ķermenis ir aizsargāts no sirds un asinsvadu slimībām, neiroloģiskām un vēža slimībām, antioksidanti kavē hroniskas problēmas, kā kataraktu. Rekomendācijas, kuras ir balstītas uz epidemioloģiskajiem pētījumiem, ir tādas, ka augļi un dārzeņi nodrošina labāko aizsardzību pret slimībām, kuras varētu attīstīties oksidatīvā stresa darbības dēļ [Cao et. al., 1998].

Vitamīns C, vitamīns E, alfa-karotīns, likopeīns, selēns, polifenoli, glutations, proksidāze un cistīns ir galvenie antioksidantu avoti. Augļu sulas, dzērieni un karstie dzērieni satur lielu daudzumu antioksidantu, kā polifenolus, vitamīnu C, vitamīnu E, utt. [Ramadan-Hassien, 2008]. Augļu sulas un karsto dzērienu patēriņš ir saistīts ar mirstības un mirstības, kura ir saistīta ar deģeneratīvajiem slimībām, samazināšanu. Uz epidemioloģiskajiem pētījumiem balstītas rekomendācijas ir tādas, ka augļi, dārzeņi un mazāk pārstrādāti pamatēdieni garantē labāko aizsardzību pret slimībām, kuras izraisa oksidatīvais stress, kā vēzis, koronārās sirds slimības, aptaukošanās, otrā tipa diabēts, hipertensija un katarakta [Halvorsen et. al., 2002].

Pārtika ir viens no galvenajiem antioksidantu avotiem, vidēji ar uzturu tiek uzņemtas vairāk kā 25 000 bioaktīvas pārtikas sastāvdaļas un liela daļa no tām var modificēt skaitu procesu, kuri ir saistīti ar dažādām slimībām. Dārzeni un augļi ir bagātīgi ar antioksidantiem, tie ir atrodamī arī graudaugos, tējās, pākšaugos, riekstos un daudzos citos pārtikas produktos. Samazināts bagātīga uztura patēriņš var palielināt oksidatīvā stresa iespējamību, kas var novest līdz šūnu bojājumiem, tādejādi dabisko antioksidantu uzņemšana var sniegt aizsardzību pret brīvo radikāļu izraisītām slimībām. Augu bāzētai pārtikai ir lielāks antioksidantu sastāvs par dzīvnieku bāzētu un miksētu pārtiku. Tādi dzērieni kā tēja un kafija ir ar labākām antioksidatīvām īpašībām nekā alus, vīns un limonāde. Piena produktiem, gaļai un zivīm parasti ir zems antioksidantu sastāvs. [Carlsen et. al., 2010].

Cilvēki gadsimtiem ilgi ir lietojuši augus pamatvajadzībām – pārtikai, drēbēm, patvērumam un medicīnai. Tradicionālā vai tautas medicīna pasaulē ir dažādu paaudžu ārstu terapeitiskā pieredze ar vietējās apkārtnes augiem. Indieši, ķīnieši, ēģiptieši, grieķi, sīrieši un daudzi citi tradicionālajā medicīnā izmanto dabiskas substances, kas galvenokārt ir iegūtas no augiem, lai ārstētu dažādas slimības. No seniem laikiem cilvēki, zinot vai nezinot, pārtikā lieto dažādus augļus, dārzeņus un uzņem zāles no augu, dzīvnieku vai minerālu avotiem, kuri satur antioksidantus, un ir atbildīgi par vairākiem labvēlīgiem efektiem veselībai. Tradicionālā medicīna ķermeni uzskata par vienotu organismu ar dinamiskiem procesiem, kuri uztur ķermenī balansu un veselību. Pasaules mērogā ir vērā ņemama un pamatota tradicionālās medicīnas efektu atzīšana. Vairāki dabisku avotu savienojumi tiek izmantoti kā zāles – oriģinālā vai semi-sintētiskā formā. No augiem iegūtie savienojumi var kalpot arī kā zāļu prekursori, prototipi un farmakoloģiskās zondes [Salim et. al., 2008].

Mūsdienās, pamudināt uz daudzveidīgu uzturu (veselīgu pārtiku ar antioksidantu aktivitāti) joprojām ir vislabākais padoms, lai iegūto vēlamu efektu no antioksidantiem un citiem pārtikas bioaktīvajiem komponentiem. Vienlaikus ir arī jāizvairās no oksidējošajiem avotiem (cigaretēs, alkohola, ķīmikālijām, stresa utt.), lai saglabātu veselību. Nepieciešams turpināt pētījumus, lai noteiktu terapeitiski nozīmīgas sastāvdaļas un uztura sastāvdaļas, kurām piemīt antioksidatīvā aktivitāte, kvantificēt šīs sastāvdaļas un novērtēt to potenciālu in vivo antioksidatīvo aktivitāti un to iedarbību ar mērķa audiem. Ļoti svarīgi ir atklāt saistību starp antioksidantu uzņemšanu un to no devas atkarīgajiem efektiem vai sekām. Ņemot vērā pašreizējo izpratni, nākotnē antioksidantu nozīme cilvēka veselības jomā kļūs neapšaubāma. Tā kā klīniskie pierādījumi parādās un mūsu izpratne par genomu atšķirībām

krietni uzlabojas, ir jāpierāda antioksidantu īpašā loma dažādās sugās vai to struktūru atšķirību. Nākotnē ir lielas cerības uzzināt jaunu informāciju par brīvo radikāļu bioloģiju un antioksidantiem, kā arī par to, ka šīs pamatzināšanas tiks pielietotas praktiski, lai nodrošinātu veselīgu dzīvesveidu. Izstrādāt koordinētu pētniecības sadarbību, iesaistot biomedicīnas zinātniekus, fitoķīmiskos pētniekus, uztura speciālistus un ārstus, ir pirmais būtiskais solis, lai mēs spētu novērtēt antioksidantu lomu veselībā un slimībās [Saikat et. al., 2011].

1.3.1. Antoksidantu veidi

Dabīgie antioksidanti ir vairāku augu un dārzeņu sastāvā un ir piesaistījuši lielu publisko un zinātnisko interesi. Dabīgie antioksidanti veidojas visās auga daļās. Pārtikas audi ir zem konstanta oksidatīvā stresa no brīvajiem radikāļiem, ROS un prooksidantiem, kas radušies gan eksogēni (temperatūra un gaisma), gan endogēni (ūdeņraža peroksīds un metāli). Šo iemeslu dēļ, lielākā daļa audu ir izveidojusi antioksidantu sistēmu, lai kontrolētu brīvos radikāļus, lipīdu oksidācijas katalizatorus, oksidācijas starpproduktus un sekundāros metabolisma produktus [Chen, 2008]. Šajos antioksidantu savienojumos ietilpst flavonoīdi, fenolskābes, karotenoīdi un tokoferoli, kuri var inhibēt Fe³⁺ inducētu oksidāciju, savākt brīvos radikāļus un darboties kā reducējošie līdzekļi [Ozsy et. al., 2009]. Garšvielas un augi, kurus izmanto ēdienos savas garšas dēļ un tradicionālajā medicīnā fizioloģisko efektu dēļ, bieži vien satur augstās koncentrācijās fenolsavienojumus, kuriem piemīt stipra ūdeņraža ziedošanas aktivitāte. Dabīgie antioksidanti ir tie oksidanti, kuri ir atrodami dabīgos avotos, piemēram, augļos, dārzeņos un gaļā. Ir vairāki dabīgie antioksidanti, kas ir atrodami ikdienas pārtikā, piemēram, vitamīns C (askorbīnskābe), vitamīns E (tokoferols), vitamīns A (karotenoīdi), vairāki polifenoli, ieskaitot flavonoīdus, un antocianīni, likopēns un koenzīms Q10, arī zināms kā ubikvitīns, kas ir visās eikariotu šūnās sastopams neliels 8564 Da proteīns [Muchuweti, et.al. 2007].

Uztura antioksidanti, kā askorbāti, tokoferoli un karotenoīdi, ir plaši pazīstami un ir neskaitāmas publikācijas par to efektiem uz veselību. Vitamīns C, vitamīns E un beta karotīns, citi karotenoīdi un oksikarotenoīdi, piemēram, likopēns un luteīns ir vieni no visizpētītākajiem uztura antioksidantiem. Vitamīns C tiek uzskatīts par svarīgāko ūdenī šķīstošo antioksidantu. Tam piemīt spēja neutralizēt ROS ūdens fāzē pirms lipīdu peroksidēšanās ir uzsākta. Vitamīns E, lielākais lipīdos šķīstošais antioksidants, ir visefektīvākais ķēdes pārrāvējs šūnu membrānā, kur tas aizsargā membrānas taukskābes no lipīdu peroksidēšanās. Beta karotīns un citi karotenoīdi arī aizsargā ar lipīdiem bagātos

audus. Pētījumi norāda, ka beta karotīns varētu darboties sinerģiski ar vitamīnu E. Augos flavonoīdi darbojas kā aizsardzība pret dažādiem vides stresiem. Cilvēkos flavonoīdi funkcionē kā bioloģiskās atbildes modifikatori. Flavonoīdi ir izrādījuši pretiekaisuma, pretalerģisku, antivirālu, pret novecošanu un pretvēža aktivitāti vairākos dažādos pētījumos [Sies, 1992].

Sintētiskie antioksidanti ir ķīmiski sintezēti, jo dabā tie nerodas, un tos pievieno pārtikai kā konservantus, kas palīdz novērst lipīdu peroksidāciju (Shahidi et.al., 1992).

Papildus uztura antioksidantiem organisms paļaujas arī uz vairākiem endogēniem aizsardzības mehānismiem, lai aizsargātos no brīvo radikāļu izraisītajiem šūnu bojājumiem. Enzīmi ar antioksidantu īpašībām – glutaciona peroksidāze, katalāze un superoksīda dismutāze (SOD) – metabolizē oksidatīvā stresa toksiskos starpproduktus, taču tiem optimālai katalītiskai aktivitātei nepieciešami mikroelementi kā kofaktori, piemēram, selēns, dzelzs, varš, cinks un mangāns. Tiek uzskatīts, ka neadekvāta šo mikroelementu uzņemšana ar uzturu var ietekmēt šo antioksidantu aizsardzības mehānismu efektivitāti [Duthie et. al., 1994]. Glutations, svarīgs ūdenī šķīstošs antioksidants, tiek sintezēts no aminoskābēm glicīna, glutamāta un cisteīna. Glutations tieši apslāpē ROS, piemēram, lipīdu peroksīdus, kā arī tam ir svarīga loma ksenobiotisko vielu metabolismā. Kad indivīds ir pakļauts lielam daudzumam ksenobiotiku, tad lielāks daudzums glutaciona tiek utilizēts konjugācijas reakcijās (svarīgs solis ķermeņa detoksifikācijas procesā), padarot to par netik spējīgu darboties kā antioksidants. Pētījumi rosina domas, ka glutations un vitamīns C darbojas kopā, lai neutralizētu brīvos radikāļus un tiem piemīt saudzējošs efekts vienam pret otru. Lipoīnskābe, vēl viens svarīgs endogēnais antioksidants, pēc ķīmiskās uzbūves “tiols” vai “biotols” ir sēru saturoša molekula, kura piedalās reakcijā, kas katalizē alfa-ketoskābju, kā piruvāts un alfa-ketoglutarāts, oksidatīvo dekarboksilāciju Krebsa ciklā. Lipoīnskābe var arī savu antioksidatīvo efektu radīt helatējot prooksidantu metālus. Tai piemīt arī saudzējošas īpašības pret pārējiem antioksidantiem [Kagen, 1992].

Eksogēnie antioksidanti var rasties no dabīgiem avotiem (vitamīni, flavonoīdi, antocianīni, dažādi minerāli), bet tie var būt arī sintētiski savienojumi, kā butilhidroksianisols, gallāti, utt. Palielināta interese ir par tiem antioksidantiem, kuri novērš brīvo radikāļu kaitīgo efektu cilvēku ķermenī, kā arī tauku un citu pārtikas produktu komponentu kvalitātes pasliktināšanos [Litescu et. al., 2011].

1.3.2. Antioksidantu funkcijas

ASV FDA (Pārtikas un zāļu pārvalde) antioksidantus definē tikai kā uztura bagātinātājus, kurus ir vajadzīgs uzņemt papildus pamatuzturam. Regulāra dārzeņu un augļu lietošana pārtikā ir saistīta ar samazinātu hronisku slimību risku [Dembinska et. al., 2008]. Nesen antioksidanti ir piesaistījuši sev uzmanību, jo ir ieteikti vēža profilaksei un terapijai [Kalcher et. al., 2009]. Visi antioksidanti darbojas kopā kā komanda, kas ir antioksidatīvā sistēma, kura ir atbildīga par brīvo radikāļu un to metabolītu aizvākšanu. Tomēr tas nozīmē, ka trūkums vienā komponentē var ietekmēt pārējo komponentu efektivitāti. Četri iespējamie mehānismi, kā antioksidanti funkcionē, lai mazinātu tauku un eļļu oksidēšanu, ir aprakstīti jau 1989. gadā. Antioksidantu ūdeņraža ziedošana, elektrona ziedošana, lipīdu pievienošana un kompleksa veidošanās starp lipīdu un antioksidantu. Bioloģisko molekulu, kuras ir atrodamas augos ēdienos, kumulatīvās un sinerģiskās aktivitātes ir atbildīgas par to palielinātajām antioksidatīvajām spējām [Peter, 2007].

1.3.2.1. Vitamīns C

Askorbīnskābe ir pieejama reducētā formā (L-askorbīnskābe) un oksidētā formā (L-dehidroaskorbīnskābe). Tā ir atrodama citrus augļos, piparos, zemenēs, tomātos, brokoļos un daudzos dārzeņos. Vitamīna C primārā funkcija ir neitralizēt brīvos radikāļus. Tas ir ūdenī šķīstošs vitamīns, tādēļ tas var darboties gan šūnas iekšpusē, gan šūnas ārpusē. Brīvie radikāļi meklē elektronu pāri, lai atgūtu stabilitāti un vitamīns C ir lielisks elektronu avots. [Bendich, 1990].

Vitamīna C uzņemšanai ir arī aizsargājoši efekti pret plaušu, krūts, aizkuņģa dziedzeru, vēdera, dzemdes kakla, anālās atveres un mutē vēzi [Simon et. al., 2001]. Vitamīns C piedalās tirozīna, folskābes un triptofāna metabolismā, kā arī palīdz holesterīna metabolismā, palielinot tā elimināciju un tādējādi samazinot holesterīna līmeni asinīs [Rath, 1993]. Tas piedalās arī karnitīna un kateholamīnu, kas regulē nervu sistēmu, sintēzē, kā arī ir nepieciešams triptofāna pārveidošanā par 5-hidroksitriptofānu un dažādu neurotransmiteru, serotonīna, epinefrīna un dopamīna, veidošanā. Ķermenim palīdz absorbēt dzelzi un sadalīt histamīnu, kas ir svarīgi pie iekaisuma un vairākās alerģiskās reakcijās [Gaby et al., 1991].

Viena no svarīgākajām vitamīna C funkcijām ir kolagēna veidošana un uzturēšana. Kolagēns ir saistaudu pamatā un saistaudi ir atrodami ādā, saitēs, skrimšļos, mugurkaula diskos, locītavās, asinsvadu sienās, kaulos un zobos. Kolagēna proteīna hidroksilācijai

nepieciešams vitamīns C. Hidroksilācija ir process, kas ļauj molekulai iegūt labāko konfigurāciju un novērš kolagēna iespēju kļūt vājākam un jutīgākam pret bojājumiem. Vitamīns C palielina prokolagēna mesendžeru līmeņus [Gaby et al., 1991].

1.3.2.2 Vitamīns E

Vitamīns E ir viens no vissvarīgākajiem taukos šķīstošajiem primārās aizsardzības antioksidantiem. Vitamīns E ir vispārējs termins, kuru izmanto, lai apzīmētu dabīgi radušos tokoferolus un tokotrienolus. Tas agresīvi pārnes savu fenolisko ūdeņraža atomu uz lipīdu peroksilradikāli, pārveidojot to par lipīdu hidroperoksīdu un vitamīna E radikāli. Tokoferols (Vitamīns E) un tokotrienols (provitamīns E) ir spēcīgi antioksidanti, kuri nodrošina oksidatīvo stabilitāti, kā arī palīdz saglabāt karotinoīdus un citus eļļas kvalitātes rādītājus stabilus [Nem Rajesh et. al., 2009]. Vitamīns E neitralizē peroksilradikāļu starpproduktus lipīdu peroksidācijā un ir atbildīgs par polinepiesātināto taukskābju, kuras ir atrodamas šūnu membrānā un zema blīvuma lipoproteīnos, aizsardzību pret lipīdu peroksidāciju. Vitamīnam E piedēvē vairākas īpašības, sākot ar novecošanās aizkavēšanu līdz saules apdeguma dziedēšanai. Kā taukos šķīstošais vitamīns, tas var tikt uzglabāts taukaudos, aknās un citos audos. Dažas no E vitamīna funkcijām ir šūnu normālas darbības uzturēšana, kas veselīga ādai un ausiem, kā arī aizsargā eritrocītus un stiprina imunitāti. Svarīgi vitamīna E avoti ir kviešu dīgļi, rieksti, sēklas, veseli graudi, zaļi lapu dārzeņi, augu un zivju aknu eļļa [Vivek et.al., 2006].

1.3.2.3. Beta-karotīns

Beta-karotīns ir karotenoīds ar provitamīna A aktivitāti, kas ir atrodams augļos un dārzeņos. Miljoniem cilvēku attīstības valstīs beta karotīns ir galvenais avots būtiskai barības vielai – vitamīnam A (retinolam un tā esteriem). Beta karotīns spēj nešķelt pievienoties retinoīdu receptoriem, lai izveidotu vitamīnu A [Bendich et al., 1998].

Beta-karotīns ir visplašāk pazīstamais karotenoīds un tam piemīt antioksidanta īpašības, tāpēc tas spēj neitralizēt brīvos radikāļus – ROS molekulas, kas potenciāli bojājot lipīdus šūnu membrānās un ģenētiskajā materiālā, var novest līdz sirds un asinsvadu slimību vai vēža attīstībai [Pavia et. al., 1999]. Mūsdienās nav īsti skaidrs vai beta-karotīna labvēlīgie efekti ir saistīti ar to antioksidatīvo īpašību vai kādu citu neantioksidatīvu mehānismu. In vitro pētījumi vēsta, ka karotenoīdi var inhibēt tauku oksidēšanos specifiskos nosacījumos. Varētu būt, ka tiem piemīt antiaterosklerisks potenciāls, bet to efekts cilvēkos izrādās ļoti komplicēts [Young et. al., 2001].

1.3.2.4. Selēns

Selēns ir plaši pazīstams antioksidants. Tas ir nepieciešams apmēram no 20 līdz 40 enžīmiem oligoelementu sintēzei un funkcijai, starp kuriem lielākā daļa palīdz novērst šūnu bojājumus no skābekļa metabolisma blakusproduktiem, kurus sauc par ROS vai brīvajiem radikāļiem. Selēns ir neaizvietojams pareizai imūnās sistēmas darbībai un ir pierādīts, ka tam piemīt antivirālas īpašības [Mckenzie et. al., 1998]. Ietekme uz iekaisuma atbildes reakcijām arī ir novērota selēna proteīniem [Curran et al., 2005]. Selēnam ir loma arī muskuļu funkcijā, tas uzlabo izturību un atlabšanu pēc slodzes, kā arī palēnina novecošanās procesu [Suttle, 2010].

1.3.2.5. Polifenolu antioksidanti

Polifenoli, arī zināmi kā polihidroksifenoli, ir pārsvarā dabīgi, bet var būt arī sintētiski un pussintētiski organiskie savienojumi, kuri raksturojas ar lielu skaitu fenolu struktūru vienību. Šo fenolu struktūru skaits un īpašības ir pamatā to unikālajām fizikālajām, ķīmiskajām un bioloģiskajām īpašībām. Vēsturiski svarīgā tannīnu ķīmiskā klase ir polifenolu apakškopa. Vārds ir radies no sengrieķu vārda πολύς (polus), kas nozīmē daudz, un vārda fenols, kas norāda uz ķīmisko struktūru, kas izveidojas pievienojot aromātisku fenil- grupu un hidroksilgrupu, kura atrodama spirtos. Polifenoli kā termins tiek izmantots jau no 1894. gada.

Pašreizējie rezultāti stingri norāda uz polifenolu svarīgumu kardiovaskulāro slimību, vēžu un osteoporozes prevencijā, kā arī ir aizdomas par tā lomu neurodeģeneratīvo slimību un cukura diabēta prevencijā [Scalbert et al., 2005]. Ievērojams progress ir novērojams pētījumos sirds un asinsvadu slimības nozarē un mūsdienās ir plaši pieņemts fakts, ka daži polifenoli, ievadīti kā uztura bagātinātāji vai ar pārtiku, uzlabo veselības stāvokli. Uz to norāda vairāki biomarkieri, kas ir cieši saistīti ar kardiovaskulāro risku [Vita, 2005]. Epidemioloģiskajiem pētījumiem ir tendence apstiprināt polifenolu patēriņa aizsargājošo efektu pret kardiovaskulārajām slimībām.

1.3.2.6. Glutations

Glutations aizsargā šūnas no toksīniem un brīvajiem radikāļiem. Cilvēka ķermenis veido glutatīonu no trīs galvenajām aminoskābēm – cisteīna, glicīna un glutamīnskābes. Pārtikas produkti ar vislielāko glutatīona sastāvu ir avokado, greipfrūts, kartupelis, persiķis, cukini, spināti, brokoļi, arbūzs un zemenes. Zivis, gaļa un ēdieni, kuru sastāvdaļas

metabolizējas līdz sēru saturošām aminoskābēm, piemēram, olas, ir vēlamie avoti, lai uzturētu un palielinātu glutaciona līmeni ķermenī [Dolas et. al., 2015].

1.3.2.7. Peroksidāze

Peroksidāze ir enzīms, kas īpašā daudzumā ir augos, pienā un leukocītos. Sastāv no proteīnu kompleksa ar hematīna grupām, kas katalizē vairāku savienojumu oksidēšanos. Ar peroksidāzēm bagāti pārtikas produkti ir mārrutku saknes, sojas pupiņas, mango augļi un rāceņi [Dolas et. al., 2015].

1.3.2.8. Flavonoīdi

Flavonoīdi, nosaukti pēc latīņu vārda flavus, kas nozīmē dzeltens, ir augu pigmenti un augu un sēņu sekundārie metabolīti. Ķīmiski flavonoīdiem vispārējā struktūrā ir 15-oglekļa skelets, kurš sastāv no diviem fenil gredzeniem un heterocikliskā gredzena. Šīs struktūras abreviatūra ir C6-C3-C6. Pēc IUPAC nomenklatūras flavonoīdus var klasificēt:

- flavonoīdos vai bioflavonoīdos
- isoflavonoīdos, atvasināti no 3-fenil-1,4-benzopirona struktūras
- neoflavonoīdi, atvasināti no 4-fenil-1,2-benzopirona struktūras

Visas trīs augstāk minētās flavonoīdu klases ir ketonu saturoši savienojumi, tāpat kā antoksantīni (flavoni un flavanoli).

Flavonoīdi sastāv no lielas grupas polifenolu savienojumu, kuriem ir benzo-gamma-pirona struktūra un tie augos ir visuresoši. To sintēze notiek fenilpropanoīdu ceļā. Pieejamie literatūras pārskati parasti liecina par sekundāro metabolītu polifenolu, to skaitā arī flavonoīdu dažādām farmakoloģiskām aktivitātēm. Flavonoīdi ir hidroksilēti fenolsavienojumi un ir zināms, ka augi tos sintezē kā atbildi pret mikrobu infekciju. To īpašības ir atkarīgas no struktūras. Flavonoīdu ķīmiskā daba ir atkarīga no to struktūras, hidroksilācijas un polimerizācijas pakāpes, kā arī no konjugātiem. Flavonoīdi ir sastopami kā aglikoni, glikozīdi un metilēti derivāti. Izplatītākā struktūra ir aglikons. Sešu locekļu gredzens kondensēts ar benzēna gredzenu ir vai nu alfabirons vai tā dihidroderivāts. Benzola aizvietotāja pozīcija sadala flavonoīdu klasi flavonoīdos (otrā pozīcija) un izoflavonoīdos (trešā pozīcija). Flavanoli no flavanoniem atšķiras ar hidroksilgrupu trešajā pozīcijā un dubultsaiti starp otro un trešo oglekļa atomu. Glikozīdiem veidojoties, glikozīdiskā saite parasti atrodas 3. vai 7. pozīcijā un ogļhidrāts var būt L-ramnose, D-glikoze, glikohamnoze, galaktoze vai arabinoze. Interesi par šiem savienojumiem raisa to potenciālais labums veselībai antioksidantīvo īpašību dēļ. Funkcionālās hidroksilgrupas

flavonoīdos regulē to antioksidatīvos efektus neitralizējot brīvos radikāļus un/vai helatējot metāla jonus. Tas varētu būt svarīgs elements radikāļu veidošanās prevencijā [Kelly et. al., 2002].

Flavonoīdi ir plaši izplatīti augos, pildot vairākas funkcijas. Tie ir vissvarīgākie augu ziedu krāsas pigmenti, veidojot dzeltenu vai zilu, sarkanu pigmentāciju ziedlapiņās, lai piesaistītu apputeksnētājus. Lielākos augos tie ir iesaistīti UV filtrācijā, simbiotiskā slāpekļa fiksācijā un ziedu pigmentācijā. Tie var darboties arī kā ķīmiskie signāli, fizioloģiskie regulatori un šūnu cikla inhibitori. Augs caur sakni var izdalīt flavonoīdus, lai simbiotiski palīdzētu citiem augiem, piemēram, caur saknēm izdalās pākšaugiem - zirņiem, pupiņām, sojas pupām un ābelēm. Augsnē dzīvojošie mikrobi var sajukt flavonoīdus, kuru rezultātā tie izdala faktorus, kurus var sajukt un atpazīt augs, kā rezultātā var rasties saknes deformācija vai vairākas šūnu atbildes kā izmaiņas jonu plūsmā un sakņu mezgliņa izveidošanās. Papildu tam dažiem flavonoīdiem piemīt augšanu kavējoša aktivitāte pret organismiem, kuri izraisa augu slimības [Rice-Evans et.al., 1995].

Ir zināms vairāk nekā 5000 dabisko flavonoīdu. Flavonoīdi, īpaši tādi flavonoīdi kā katehīni, ir visbiežāk sastopamā polifenolu grupa cilvēku uzturā un tie ir atrodami arī visos augos. Kvercetinā arī ir atrodams visos augos, bet mazākā daudzumā. Plašā flavonoīdu izplatība, to dažādība un relatīvi zemā toksicitāte, salīdzinot ar citiem aktīvajiem augu savienojumiem, nozīmē to, ka daudzi dzīvnieki, ieskaitot cilvēkus, ar uzturu uzņem ievērojamu daudzumu flavonoīdu. Pārtikas produkti ar augstu flavonoīdu saturu ir pētersīļi, sīpoli, mellenes un citas ogas, melnā un zaļā tēja, banāni, visi citrusaugļi, ginkgo biloba, sarkanais vīns, smiltsērķšķi, griķi un tumšā šokolāde [Hollman et. al., 1997].

In vitro flavonoīdiem ir novērota plaša spektra bioloģiskā un farmakoloģiskā aktivitāte. Piemēram, pretalerģiskās, pretiekaisuma, antioksidanta, antibakteriālās, pretsēnīšu, pretvīrusu, pretvēža un pret caurejas īpašības. Tie inhibē topoizomerāzes enzīmus un inducē DNS mutācijas jaukta tipa leukēmijas gēnā. Tomēr vairumā gadījumu flavonoīdu farmakoloģiskie efekti nav pārbaudīti in vivo un klīniskajos pētījumos, tāpēc ir pārāgri spriest par to labvēlīgo vai kaitīgo ietekmi uz cilvēku veselību.

Vairākos pētījumos novērots, ka flavonoīdi tiek slikti absorbēti cilvēka ķermenī (mazāk kā 5%) un tas, kas tiek absorbēts, tiek ātri metabolizēts un izvadīts. Šie novērojumi liecina, ka flavonoīdiem ir niecīga antioksidatīvā darbība un asins antioksidatīvā kapacitāte, kura novērojama pēc flavonoīdu bagātas pārtikas patēriņa [Tripoli et. al., 2007].

Tiek uzskatīts, ka iekaisums varētu būt saistīts ar vairāku lokālu un sistēmisku slimību izcelsmi, tādām kā vēzis, sirds un asinsvadu slimības, cukura diabēts un celiakija. Flavonoīdi varētu ietekmēt pretiekaisuma mehānismus, inhibējot reaktīvos skābekļa vai slāpekļa savienojumus. Tiek uzskatīts, ka tie arī spēj inhibēt enzīmu aktivitāti, kuri ir iesaistīti brīvo radikāļu radīšanā, piemēram, ciklooksigenāzi, lipoksigenāzi vai inducējamu slāpekļa oksīda sintāzi, kā arī modificēt intracelulārus signālu veidus imūnās šūnās vai smadzeņu šūnās pēc insulta. Procianidīni, viena no flavonoīdu klasēm, arī izrāda pretiekaisumu aktivitāti, ieskaitot arahidonskābes ceļa modulāciju, gēnu transkripcijas, iekaisuma enzīmu ekspresiju un aktivitāti, kā arī pretiekaisuma mediatoru sekrēcijas inhibēšanu.

Klīniskajos pētījumos, kuros apskatītas sakarības starp flavonoīdu patēriņu un vēža prevenciju/attīstību ir konfliktējoši rezultāti, iespējams tādēļ, ka lielākā daļa pētījumu ir retrospektīvi dizaina jomā un izmanto nelielu izlases lielumu. Divi vērā ņemami izņēmumi ir kuņģa vēzis un ar smēķēšanu saistītie vēži. Flavonoīdu lietošana uzturā ir saistīta ar samazinātu kuņģa vēža risku sievietēm un samazinātu elpošanas trakta vēža risku smēķētājiem [Koen et. al., 2005].

Sirds un asinsvadu slimības ir starp visvairāk pētītajām slimībām, kuras varētu ietekmēt flavonoīdi, kas uzņemti ar uzturu. Pētījumos ir novēroti vairāki iespējamie mehānismi, piemēram, ka flavonoīdi inhibē koagulāciju, trombu veidošanos un trombocītu agregāciju, samazina aterosklerozes risku, samazina arteriālo asinsspiedienu un hipertensijas risku, samazina oksidatīvo stresu, ietekmē vaskulāros iekaisuma mehānismus, uzlabo endotēlija un kapilāru funkciju, modificē asins lipīdu līmeņus, regulē ogļhidrātu un glikozes metabolismu. Flavonoīdiem piemīt tieša antibakteriāla aktivitāte, sinerģiska aktivitāte ar antibiotikām un spēja nomākt bakteriālos virulences faktorus vairākos in vitro un dažos in vivo pētījumos.

Kā uztura sastāvdaļai flavonoīdiem piemīt veselību veicinošas īpašības to augstās antioksidantu kapacitātes dēļ gan in vivo, gan in vitro sistēmās. Flavonoīdiem piemīt spēja inducēt cilvēka aizsargenzīmu sistēmas. Vairākos pētījumos novērotas flavonoīdu aizsargājošais efekts pret vairākām infekcijām (gan bakteriālām, gan virālām) un deģeneratīvām slimībām kā sirds un asinsvadu slimībām, vēzi un citām, ar vecumu saistītām, slimībām. Flavonoīdi strādā arī kā sekundārā antioksidantu aizsardzības sistēma augu audos pret dažādiem abiotiskiem un biotiskiem stresiem. Tie atrodas mezofilu šūnu kodolā un ROS ģenerācijas centrā, regulē tādu augšanas faktorus kā augsns [Cook et. al., 1996].

Flavonoīdi ir grupa dabisku savienojumu ar dažādām fenolstruktūrām, kas atrodamas augos. 1930. gadā jauns savienojums tika izolēts no apelsīniem. Tajā laikā domāja, ka tas ir kādas jaunas vitamīnu klases savienojums un tika devēts par vitamīnu P. Laikam ejot, kļuva skaidrs, ka šis savienojums nav vitamīns, bet flavanoīds un kopš tā laika ir vairāk 5000 dažādu flavonoīdu ir identificēti.

Spektroskopiskajos flavonoīdu pētījumos ir novērots, ka vairums flavonu un flavonolu uzrāda divas galvenās absorbcijas joslas: josla 1 (320-385 nm) attēlo pirmā apļa absorbciju un josla 2 (250-285 nm) attēlo otra riņķa absorbciju. Flavonoīdu skeletam pievienotās funkcionālās grupas var izraisīt nobīdi absorbcijā. 3-hidroksilgrupas trūkums flavonos atšķir tos no flavonoliem. Flavanoniem ir piesātināts heterociklisks savienojums, bez konjugātiem starp citiem gredzeniem, ko var noteikt pēc to UV spektra īpašībām [Lopez et al., 2001].

Flavonoīdi veicina antioksidantu aktivitāti, šūnu stabilitāti un normālu audu augšanu un atjaunošanos viscaur ķermenim. Tie darbojas arī kopā ar vitamīnu C, lai samazinātu oksidatīvo stresu ūdens bāzētajā šūnas proporcijā un varētu palēnināt dažus novecošanas efektus. Ir vairāk kā 5000 unikālu flavonoīdu un visefektīvākie tie ir tad, kad to vairāku tipi tiek uzņemti reizē. Pārtikas produkti, kuri ir bagāti ar flavonoīdiem, ir dzērvenes, kāposti, bietes, dažādas ogas, sarkanās un melnas vīnogas, apelsīni, citroni, greipfrūti un zaļā tēja [Kumar et. al., 2013].

1.4. VACCINIUM SPP. OGAS

Vaccinium ir sauszemes krūmu ģints, kas pieder pie Ēriku (*Ericaceae*) dzimtas. Tā sastāv no apmēram 450 sugām, no kurām trīs (mellenes, dzērvenes un brūklenes) tiek kultivētas jau no divdesmitā gadsimta. *Vaccinium* augi ir ekonomiski nozīmīgi to lielās uzturvērtības un to lielās antioksidatīvās un pretiekaisuma darbības dēļ, kas labvēlīgi ietekmē cilvēku veselību [Prior et. al., 1998]. *Vaccinium* ģints, kā jau lielākā daļa ogu, ir bagāta ar flavonoīdiem, tannīniem un fenolskābēm. Vairāki pētījumi norāda, ka ogām ir vairākas veselībai labvēlīgas īpašības, kuras tiek saistītas ar šādiem bioaktīvajiem savienojumiem, īpaši antociāniem [Seeram, 2008].

Mellene ir zināma kā “ilgmūžības auglis”, pateicoties tās augstajai antioksidantu kapacitātei pret brīvajiem radikāļiem un reaktīvajiem skābekļa radikāļiem. To uzskata par vienu no lielākajiem antioksidantu avotiem starp visiem augļiem un dārzeņiem [Prior et. al., 1998]. Antioksidatīvā aktivitāte, visticamāk, ir galvenais mehānisms ar kuru palielinās

ogu patēriņš ir saistīts ar iespēju mazināt dažādu slimību attīstību, kuru attīstība tiek stimulēta ar oksidatīvajiem procesiem [Halliwell, 2006].

Galvenās hroniskās slimības, kuras tiek saistītas ar melleņu iespēju aizkavēt un ārstēt, ir vēzis [Katsube et al., 2003], cukura diabēts [Martineau et. al., 2006], sirds un asinsvadu slimības [Heinonen et. al., 1998] un neurodeģeneratīvās slimības [Krikorian et. al., 2010]. Ir novērots, ka mellenei ir arī labvēlīga ietekme uz redzi [Kalt et. al., 2010].

In vitro atrastā dzērveņu spēja traucēt *Helicobacter pylori* adhēziju ir rosinājusi veikt randomizētu klīnisko pētījumu, lai novērtētu iespējamo aditīvo efektu parastai terapijai sievietēm ar urinārā trakta infekciju, kurā grupai ar dzērveņu uzņemšanu bija ievērojami labāki rezultāti, kā placebo grupai [Shmuely et. al., 2007]. Papildus tam, ir arī prelimināri pierādījumi dzērveņu nespecifiskajiem antivirālajiem efektiem [Lipson et. al., 2007].

Vaccinium spp. ogu polifenoli un flavonoīdi var samazināt aterosklerozes risku, palielinot zema blīvuma lipoproteīna rezistenci pret oksidāciju, inhibējot trombocītu agregāciju, samazinot asinsspiedienu, vai uzrādot citus anti-trombotiskus un pretiekaisuma mehānismus [Mckay et. al., 2007]. Ogas ir atbildīgas arī par zema blīvuma lipoproteīnu inducētu ekspresiju un palielinātu holesterīna uzņemšanu hepatocītos [Chu et. al., 2005]. Veseliem cilvēkiem zemu kaloriju ogu sulas patēriņš ir saistīts ar labvēlīgāku postprandiālās glikēmijas atbildi, kas varētu būt noderīga indivīdiem ar traucētu glikozes panesamību [Wilson et. al., 2008]. Dzerot dzērveņu sulu 4 mēnešus, žurkām palielinājās plazmas superoksīda dismutāzes aktivitāte un samazinājās nitrāta, nitrītu un malondialdehīda koncentrācijas [Deyhim et. al., 2007].

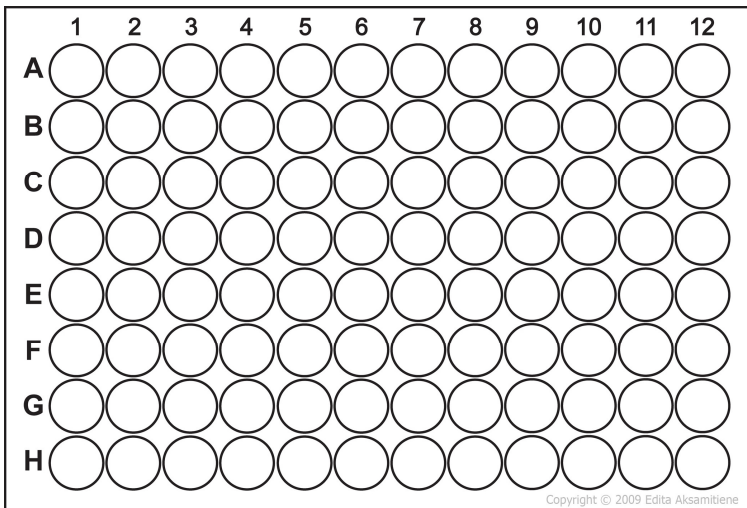
Brūkleņu ekstrakti var inhibēt hepatīta C vīrusa ekspresiju [Takeshita et. al., 2009] un cilvēka promielocītiski jutīgās leukēmijas HL60 šūnu augšanu [Skupien et al., 2006]. Brūkleņu lapas ir bagātas ar antioksidantiem un spēj mazināt holesterīna līmeni, un ārstēt vēdera traucējumus, reimatiskās slimības un nieru infekcijas [Novelli, 2003].

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1 Reāģenti, palīgvielas un materiāli

1. Sausie melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu spiedatlieku ekstrakti (Vides zinātņu nodaļa, LU)
2. Metanols, CH_3OH , (Sigma-Aldrich)
3. Heksāns, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$; (Sigma-Aldrich)
4. Folino-Čikalto (Folin-Chicaulteau) reāģenti (Sigma-Aldrich)
5. Gallu skābe (Sigma-Aldrich)
6. NaNO_2 (Sigma-Aldrich)
7. AlCl_3 (Sigma-Aldrich)
8. NaOH (Sigma-Aldrich)
9. NaHCO_3 (Sigma-Aldrich)
10. Rutīns (Sigma-Aldrich)
11. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikālis (DPPH) (Sigma-Aldrich)
12. Sērskābe (Sigma-Aldrich)
13. Nātrija fosfāts (Sigma-Aldrich)
14. Amonija molibdāts (Sigma-Aldrich)
15. Askorbīnskābe (Sigma-Aldrich)
16. Superoksīda dismutāzes (SOD) mērīšanas reāģentu komplekts (Sigma-Aldrich Cat. No 19160)
17. 96-lauciņu mikroplates, Sarstedt, Vācija;
18. Mikropipetes (10-100;20-200 μL), Sarstedt, Vācija;
19. Multikanālu pipete, Sarstedt, Vācija;
20. Plates pārklājošas plēves, Sarstedt, Vācija;
21. Šķidruma uzpildes vanniņas, Sarstedt, Vācija;
22. Automātiskā mikropipete (100 – 1000 μL , SmartAcumax, HI 209035); Sarstedt, Vācija;
23. Pipešu uzgaļi, Sarstedt, Vācija;



Attēls 2.1.1 96-lauciņu mikroplate

2.1.2. Aparatūra

1. TEKAN Infinite 200 PRO, Tecan Group Ltd, SUI
2. BIOTEK Elx808 BioTek Instruments, VT, USA
3. Analītiskie svāri Precisa XB 120 A, SERIES 320 XB D99 – D9 – 030.
4. Centrifūga, Mikro 200R, HettichZentrifugen, sērijas Nr. D – 78532;
5. Vortex maisītājs, YellowLine TTS 2, sērijas Nr. 03.169241;

2.2. Metodes

2.2.1 Totālo polifenolu satūra mērīšana

Mērījumi notika 96-lauciņu mikroplatē. Folino-Čikalto reaģents atšķaidīts 1:10 ar destilēto, dejonizēto ūdeni (100 mikrolitri) tika pievienots 50 mikrolitriem ekstraktu šķīdumam metanolā (1mg/ml) triplikātos. Reakcijai atļauj notikt 5 minūtes. Pēc 5 minūtēm pievieno 80 mikrolitrus 7,5% nātrija bikarbonātu šķīduma. Plati inkubē 25 grādos pēc Celsija, 90 minūtes tumsā. Gallu skābes standartlīknei sagatavo atšķaidījumu sēriju 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml un 0,03125mg/ml. Gallu skābes paraugus 96-lauciņu platē apstrādā tāpat kā ogu ekstraktus. Reaģentu kontrolei 96-lauciņu plates 3 lauciņos ekstraktu vietā iemēra 50 mikrolitrus metanola un citos 3 lauciņos gallu skābes vietā 50 mikrolitrus ūdens.

Absorbciņa tika mērīta 750nm un gallu skābe tika izmantota, lai iegūtu kalibrācijas līkni. Totālo fenolu saturu aprēķināja kā vidējo no 3-4 eksperimentiem un izteica kā mg/g galluskābes ekvivalenti, un rezultāti aprēķināti kā vidējais ar standartnovirzi.

2.2.2 Totālo flavonoīdu satura mērīšana

96-lauciņu mikroplatē pie dažādu atšķaidījumu 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,03125 mg/ml ogu ekstraktu šķīdumiem (50 mikrolitri) tika pievienoti 15 mikrolitri 5% NaNO₂ un 10% AlCl₃ un 100 mikrolitri 1M NaOH. Rutīna šķīduma ūdenī standartlīkne tika pagatavota atšķaidījumu sērijai – 5 mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml. Rutīna atšķaidījumiem (50 mikrolitri) arī tika pievienoti 15 mikrolitri 5% NaNO₂, 10% AlCl₃ un 100 mikrolitri 1M NaOH. Reaģentu kontrolei ekstraktu vietā tika ņemts metanols un rutīna reaģentu kontrolei ūdens.

Šķīduma absorbcija tika mērīta 506 nm. Totālais flavonoīdu saturs tika aprēķināts pēc kalibrācijas līknes, kura tika iegūta no rutīna standartlīknes un aprēķināts kā rutīna ekvivalenti mg/g. Eksperimenti atkārtoti 3-4 reizes, un rezultāti aprēķināti kā vidējais ar standartnovirzi.

2.2.3 DPPH brīvā radikāļa koncentrācijas mērīšana

Dažādu koncentrāciju (1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,0625mg/ml) 20 μl ogu ekstraktu šķīdumiem tika pievienots 180 μl 0,5 mM DPPH metanola šķīduma. Reaģentu kontrolei bija metanols, kā reference tika izmantota askorbīnskābe tādās pašās koncentrācijās kā ogu ekstrakti. Pēc 30min inkubēšanas tumšā vietā tika mērīta absorbcija 517nm. DPPH radikāļu neitralizēšanas aktivitāte tika aprēķināta pēc vienādojuma $(1 - (\text{paraugaOD}/\text{blankaOD})) * 100$ un izteikta procentos. OD ir optiskais blīvums. Eksperimenti atkārtoti 3-4 reizes, un rezultāti aprēķināti kā vidējais ar standartnovirzi.

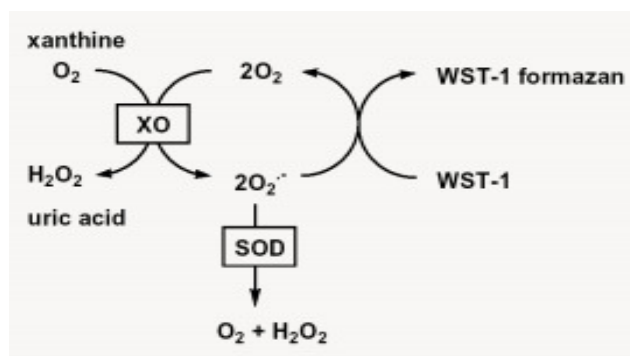
2.2.4 Totālās antioksidantu aktivitātes mērīšana

100 mikrolitru ogu ekstrakta koncentrācijā 1mg/ml Ependorfa mēģenēs samaisa ar 1ml reaģenta, kas satur 0,6 M sērskābes, 28 mM nātrija fosfātu un 4 mM amonija molibdātu un karsē 95 grādos 90min. Askorbīnskābes atšķaidījumus metanolā standartlīknei sagatavo 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml un apstrādā tāpat kā ogu ekstraktus.

Atdzesē līdz istabas temperatūrai, iemēra ar pipeti 96-lauciņu platēs triplikātos 200 mikrolitrus un mēra absorbciju pie 695 nm. Aprēķina askorbīnskābes ekvivalentos. Reaģentu kontrolei ogu ekstrakta vai askorbīnskābes vietā ir metanols.

2.2.5 Superoksīda dismutāzes aktivitātes mērīšana

Superoksīda dismutāzes aktivitātes mērīšanas testa komplektā ir reaģenti, kas ļauj producēt superoksīda anjonu, kuru SOD tālāk dismutē ūdeņražā peroksīdā un molekulārajā skābeklī. Superoksīda anjons izdalās ksantīna reakcijā ar ksantīnoksidāzi. Reducēšanas ātrums ar molekulāro skābekli ir lineāri saistīts ar ksantīna oksidāzes aktivitāti, kuru inhibē SOD. Atbrīvoto superoksīda anjonu daudzumu mēra ar Dojindo's ūdenī šķīstošo sāli WST-1 (2-(4-lodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazoliju, kurš veido krāsu, kad tiek reducēts ar superoksīda anjonu. Šī ir kolorimetriskā metode, kurā pēc krāsas intensitātes var aprēķināt superoksīda anjona līmeni.



Attēls 2.2.5. Superoksīda dismutāzes testa komplekta darbība.

20 mikrolitriem ogu ekstraktu dažādās koncentrācijās šķīdumiem pievieno 20 mikrolitrus destilēta ūdens, katram pievieno 200 mikrolitru WST Working Solution un 20 mikrolitrus Enzyme Working Solution. Pirmai reaģentu kontrolei 96-lauciņu platē ogu ekstraktu vietā iemēra 20 mikrolitrus destilēta ūdens un pievieno 200 mikrolitrus WST Working Solution un 20 mikrolitrus Enzyme working solution. Otrajā reaģentu kontrolē ir ogu ekstrakti, 20 mikrolitri atšķaidīšanas buferšķīdums un 200 mikrolitri WST Working Solution, trešajā ir 20 mikrolitri destilēta ūdens un tikpat atšķaidīšanas buferšķīduma ar 200 mikrolitriem WST Working Solution. Plati inkubē 37 grādos pēc Celsija 20 minūtes. Mēra absorbciju 450 nm. Aprēķina superoksīda dismutāzes aktivitāti pēc formulas:

$$\text{SOD aktivitāte (inhibīcijas \%)} = \frac{(\text{reaģenti 1} - \text{reaģenti 3}) - (\text{Paraugšs} - \text{reaģenti 2})}{(\text{reaģenti 1} - \text{reaģenti 3})} * 100.$$

Tabula 2.2.5.1

Mikroplates lauciņu saturs

	Sample	Blank 1	Blank2*	Blank 3
Sample solution	20 µl		20 µl	
ddH2O		20 µl		20 µl
WST working solution	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzyme working solution	20 µl	20 µl		
Dilution buffer			20 µl	20 µl

Datu aprēķināšana

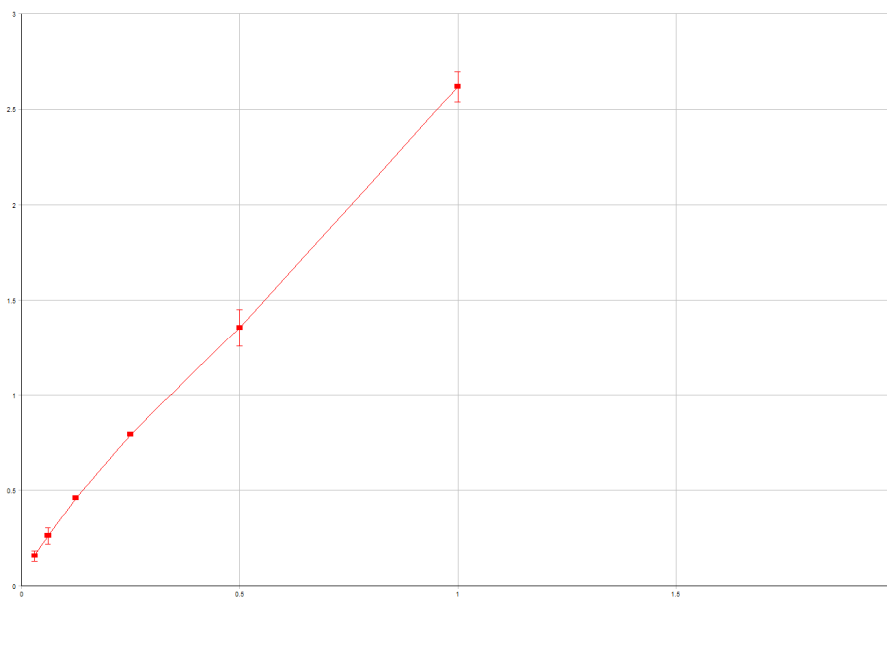
Dati aprēķināti kā vidējais no triplikātiem ar standartnovirzi, izmantojot datorprogrammas GraphPad Prism 6.00 un MS Excel.

Rezultāti ir statistiski ticami, ja $P \leq 0,05$. Divu mainīgo korelācijas aprēķiniem tika izmantots Pīrsona koeficients.

3. REZULTĀTI

3.1. Totālais polifenolu saturs

Totālā polifenolu satura mērīšanai izmanto gallu skābes ekvivalentus, kas rāda, cik mg uz g ekstraktu būtu gallu skābes, ja visi polifenoli sastāvētu tikai no gallu skābes.



Attēls 3.1.1. Galluskābes standartlīkne. Uz y ass parādīta absorbcija (OD) un uz x gallu skābes koncentrācija.

Izmantoto koncentrāciju diapazonā novērota laba linearitāte un atbilstoši koncentrācijas pieaugumam absorbcijas pieaugums. Totālais fenolu saturs augu ekstraktos tika izmērīts ar Folino Čikolto reaģentu un aprēķināts galluskābes ekvivalentos kā mg/g (Tabula 3.1.1), izmantojot iegūto galluskābes standartlīkni (Attēls 3.1.1).

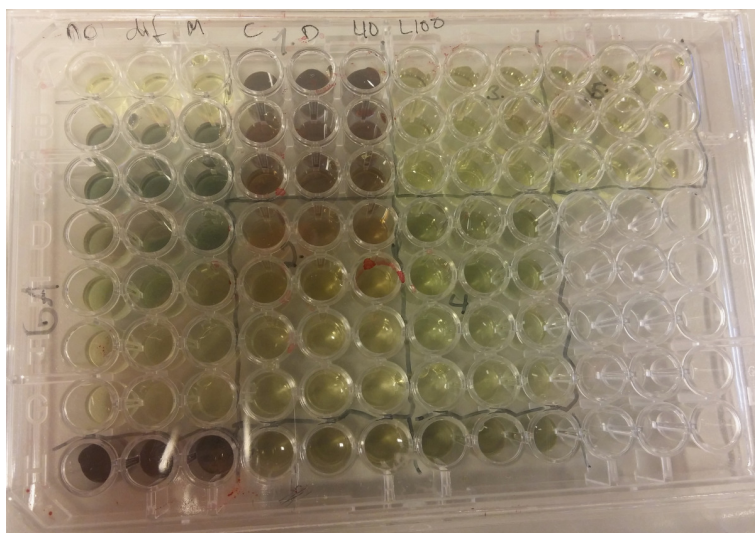
Totālais fenolu saturs ogu ekstraktos

	GSE mg/g	S.D.
Vaccinium myrtillus	712	47
Vaccinium corymbosum	710	49
Vaccinium macrocarpon	667	17
Vaccinium oxycoccus	883	15
Vaccinium vitis-idaea	849	27

Vaccinium myrtillus – mellenes, Vaccinium corymbosum – krūmmellenes, Vaccinium macrocarpon – lielogu dzērvenes, Vaccinium oxycoccus – dzērvenes, Vaccinium vitis-idea – brūklenes. GSE – gallu skābes ekvivalenti, S.D. – standartnovirze.

Vislielākais totālais fenolu saturs ir purva dzērvenei un brūklenei, vismazākais lielogu dzērvenei.

Atšķaidītais Folino-Čikalto reaģents ir zaļgani dzeltenā krāsā, bet reģējot ar polifenoliem rodas tumši zaļa vai brūnganzaļa krāsa (attēls 3.1.2.).

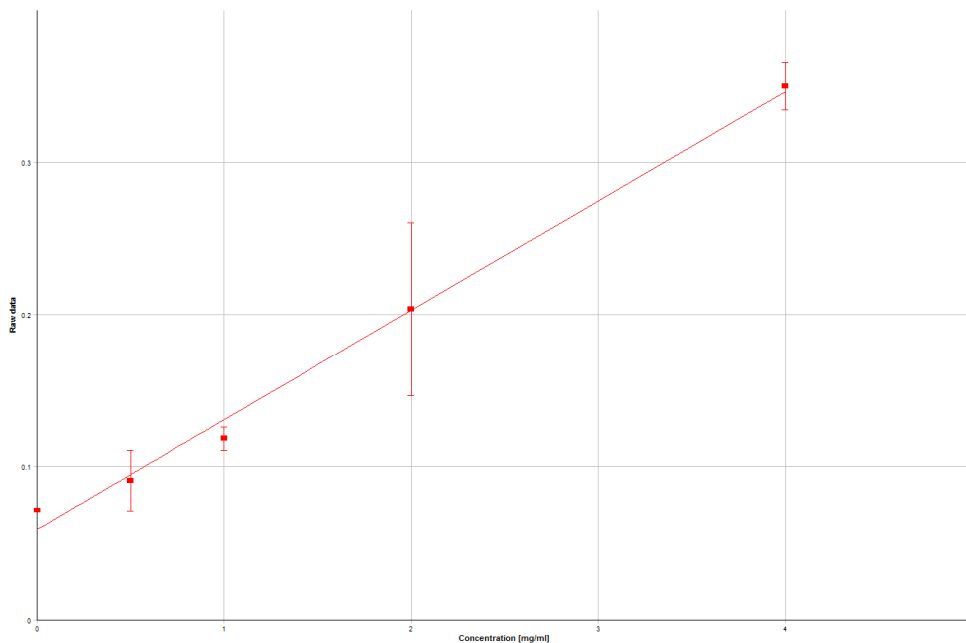


Attēls 3.1.2. Mikroplate ar gallu skābi un ekstraktiem dažādās koncentrācijās

Attēlā 3.1.2. parādīts paraugu izkārtojums mikroplatē un radusies krāsa. Lauciņos no A1-3 ekstraktu vietā ir destilēts ūdens, bet visiem paraugiem tika pievienots Folino-Čikalto reaģents un nātrija bikarbonāta 7,5% šķīdums. B1-3 līdz G 1-3 ir galluskābes atšķaidījumi koncentrācijās 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml un 0,03125mg/ml. Ekstraktu koncentrācijas bija 0,5 mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml. Pirmajos triplikātos ir augstākā koncentrācija un ar katru nākamo pazeminās līdz beidzamajā triplikātā ir zemākā koncentrācija. Ar H1-3 līdz C4-6 ir mellene, D3-6 līdz G3-6 ir krūmmellene, H1-3 līdz C7-9 ir lielogu dzērvene, D7-9 līdz G7-9 ir dzērvene un H7-9 līdz C10-12 ir brūklene.

3.2. Totālais flavonoīdu saturs

Totālā flavonoīdu satura mērīšanai izmanto rutīna ekvivalentus, kas rāda, cik mg uz g ekstraktu būtu rutīna, ja visi flavonoīdi sastāvētu tikai no rutīna.



Attēls 3.2.1 Rutīna standartlikne. Uz y ass parādīta absorbcija (OD) un uz x rutīna koncentrācija.

Izmantoto koncentrāciju diapazonā novērota laba linearitāte un atbilstoši rutīna koncentrācijas pieaugumam absorbcijas pieaugums.

Totālais flavonoīdu saturs augu ekstraktos tika mērīts lietojot spektroskopisko metodi. Flavonoīdu saturs tika izteikts kā rutīna ekvivalenti mg/g, kas tika aprēķināts pēc rutīna standartlīknes (Attēls 3.2.1). Vislielākais totālais flavonoīdu saturs ir lielajai dzērvenei un krūma mellenēm, ievērojami mazāk ir brūklenēm.

Tabula 3.2.1

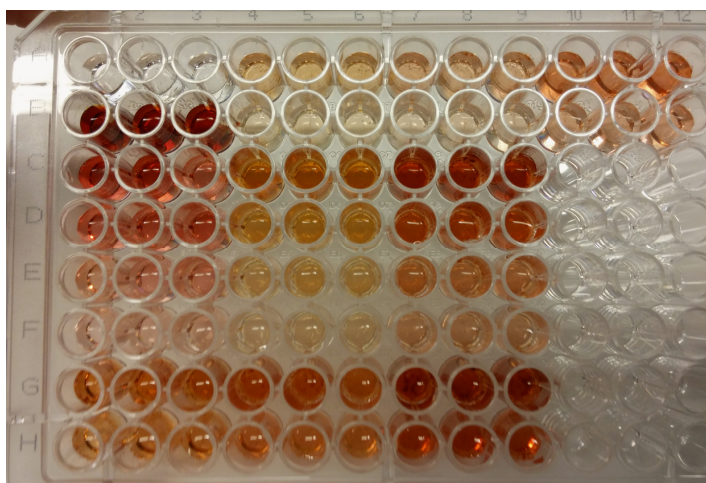
Totālais flavonoīdu saturs ogu ekstraktos

	RE mg/g	S.D.
Vaccinium myrtillus	624	35
Vaccinium corymbosum	729	27
Vaccinium macrocarpon	851	10
Vaccinium oxycoccus	514	18
Vaccinium vitis-idaea	383	12

Vaccinium myrtillus – mellenes, Vaccinium corymbosum – krūmmellenes, Vaccinium macrocarpon – lielogu dzērvenes, Vaccinium oxycoccus – dzērvenes, Vaccinium vitis-idea – brūklenes.

RE – rutīna ekvivalenti, S.D. – standartnovirze

Flavonoīdi reakcijā ar AlCl₃ un NaNO₂ sārmainā vidē veido savienojumus ar oranži līdz oranži sarkanīgam krāsojumu, kura absorbcija ir proporcionāla flavonoīdu daudzumam.



Attēls 3.2.2. Mikroplate ar rutīnu un ekstraktiem dažādās koncentrācijās

Lauciņos no A1-3 ekstraktu vietā ir destilēts ūdens, visiem tika pievienots 15 mikrolitri 5% NaNO₂ un 10% AlCl₃ un 100 mikrolitri 1M NaOH. B1-3 līdz F1-3 ir rutīna atšķaidījumi koncentrācijās 5 mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml. Ekstraktu koncentrācijas bija 0,5 mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml. Pirmajos triplikātos ir augstākā koncentrācija un ar katru nākamo pazeminās līdz beidzamajā triplikātā ir zemākā koncentrācija. Ar G1-3 līdz B4-6 ir mellene, C3-6 līdz F3-6 ir krūmmellene, G1-3 līdz B7-9 ir lielloģu dzērvene, C7-9 līdz F7-9 ir dzērvene un G7-9 līdz B10-12 ir brūklene.

3.3. DPPH

DPPH ir ļoti stabils brīvais radikālis. Pagatavotā DPPH šķīduma violetā krāsa izzūd, kad antioksidanti neitralizē DPPH, pārveidojot to bezkrāsainā produktā (2,2-difenil-1-hidrazīns), kā rezultātā samazinās DPPH absorbcija 517nm. Augu ekstraktu antioksidantu aktivitāte ir izteikta ar inhibīcijas % un IC50.

Tabula 3.3.1

Ogu ekstraktu DPPH koncentrācijas samazināšanas efekti (IC50)

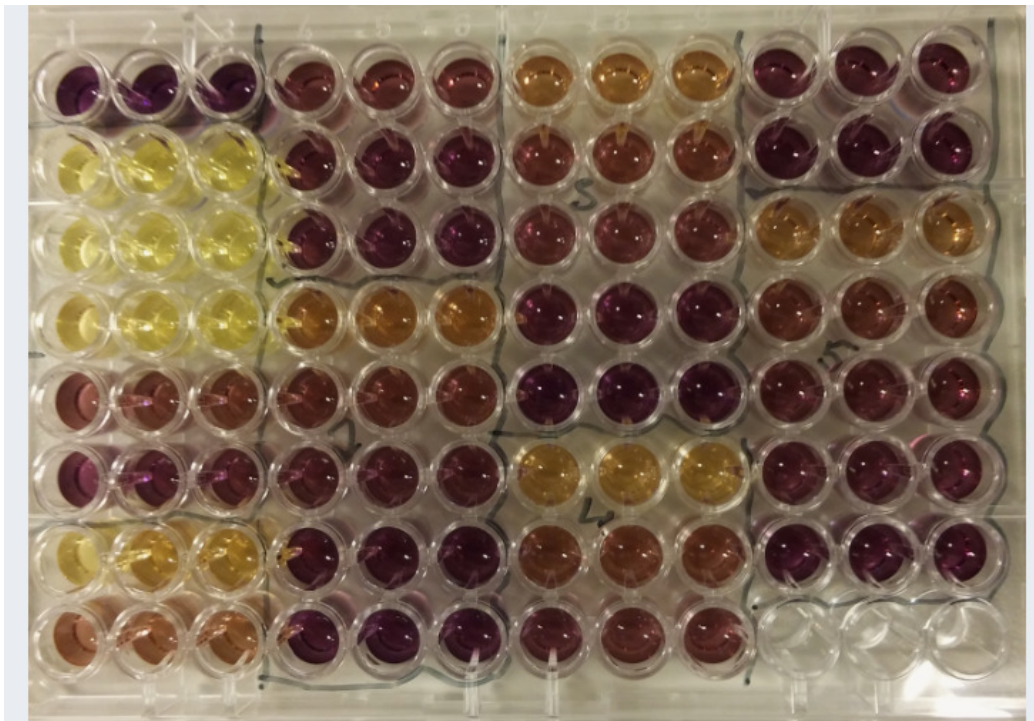
	IC50 mg/ml	S.D.
Askorbīnskābe	0.094	0.002
Vaccinium myrtillus	0.23*	0.013
Vaccinium corymbosum	0.23*	0.012
Vaccinium macrocarpon	0.11	0.007
Vaccinium oxycoccos	0.12	0.005
Vaccinium vitis-idaea	0.15	0.005

*P ≤ 0,05 vs. askorbīnskābes efektam.

Vaccinium myrtillus – mellenes, Vaccinium corymbosum – krūmmellenes, Vaccinium macrocarpon – lielloģu dzērvenes, Vaccinium oxycoccos – dzērvenes, Vaccinium vitis-idea – brūklenes.

IC50 – koncentrācija, kas samazina brīvo radikāļu koncentrāciju uz pusi, S.D. – standartnovirze.

Rezultāti rāda, ka tikai mellenēm ticami atšķiras IC50 no askorbīnskābes, bet dzērveņu un brūkleņu ekstraktu DPPH koncentrācijas samazināšanas spēja ir līdzīga askorbīnskābes.

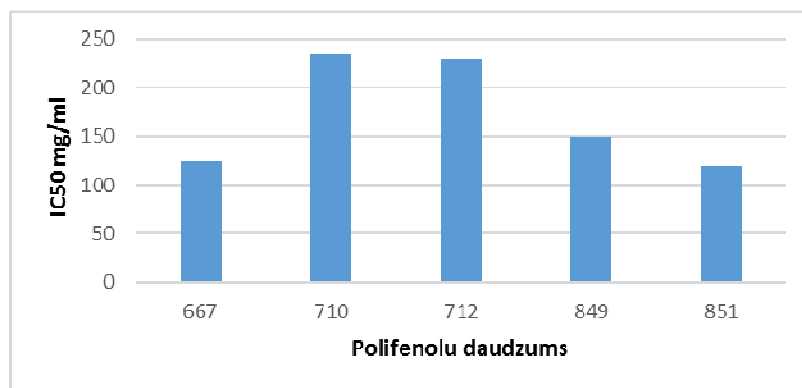


Attēls 3.3.1. Ogu ekstraktu DPPH koncentrācijas samazināšanas efekti.

Lauciņos no A1-3 ekstraktu vietā ir metanols, visiem tika pievienots 0,5 mM DPPH metanola šķīdums. Tie ir visstumšākais krāsas ziņā lauciņi ar vislielāko absorbciju. B1-3 līdz F1-3 ir askorbīnskābes atšķaidījumi koncentrācijās 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,0625mg/ml. Ekstraktu koncentrācijas bija tādas pašas. Pirmajos triplikātos ir augstākā koncentrācija un ar katru nākamo pazeminās līdz beidzamajā triplikātā ir zemākā koncentrācija. Ar G1-3 līdz C4-6 ir melle, D4-6 līdz H4-6 ir krūmmelle, A7-9 līdz E7-9 ir lieloģu dzērvene, F7-9 līdz B10-12 ir dzērvene un C10-12 līdz G10-12 ir brūkle.

Visiem ekstraktiem ir laba efektivitāte, lielajai dzērvenei un purva dzērvenei efekts ir ļoti tuvs askorbīnskābei.

Lai atrastu korelāciju starp polifenolu saturu un DPPH radikāļa neiralizēšanas spēju, izmantojām Pīrsona koeficientu.



Attēls 3.3.2. Polifenolu daudzuma GAE mg/g korelācija ar ekstraktu IC50.

Pīrsona koeficients r ir $-0,42494$, kas norāda uz vidēji stipri negatīvu sakarību. Jo vairāk polifenolu, jo lielāka ekstraktu DPPH koncentrācijas samazināšanas spēja, par ko liecina mazāka IC50.

3.4. Totālā antioksidantu aktivitāte

Totālā antioksidantu aktivitāte tika mērīta pēc zaļa fosfomolibdēna kompleksa veidošanās un aprēķināta kā askorbīnskābes ekvivalenti mg/g.

Tabula 3.4.1

Ogu ekstraktu totālā antioksidantu aktivitāte

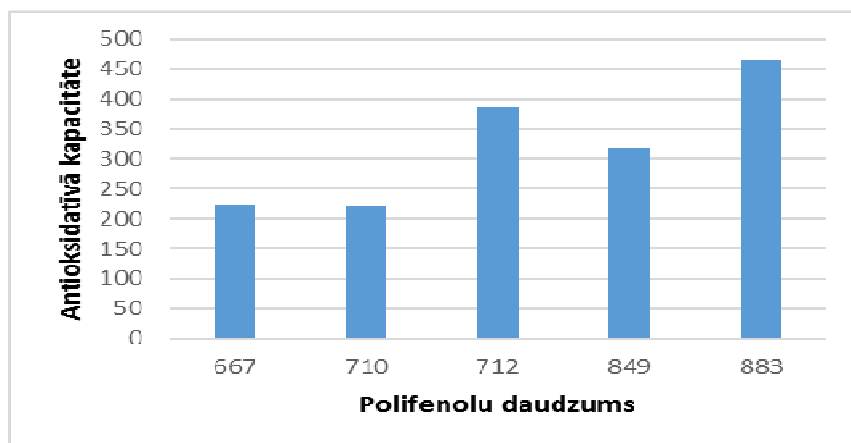
	AAE mg/g	S.D.
Vaccinium myrtillus	385	14.1
Vaccinium corymbosum	221	15
Vaccinium macrocarpon	224.5	22
Vaccinium oxycoccus	464.5	16
Vaccinium vitis-idaea	317	20

Vaccinium myrtillus – mellenes, *Vaccinium corymbosum* – krūmmellenes, *Vaccinium macrocarpon* – lielogu dzērvenes, *Vaccinium oxycoccus* – dzērvenes, *Vaccinium vitis-idea* – brūklenes.

AAE – askorbīnskābes ekvivalenti, S.D. – standartnovirze

Vislielākā totālā antioksidantu aktivitāte purva dzērveneī un mellenei, vismazākā ir lielajai dzērveneī un krūmu mellenei.

Lai atrastu korelāciju starp polifenolu saturu un totālo antioksidantu spēju, izmantojām Pīrsona koeficientu.

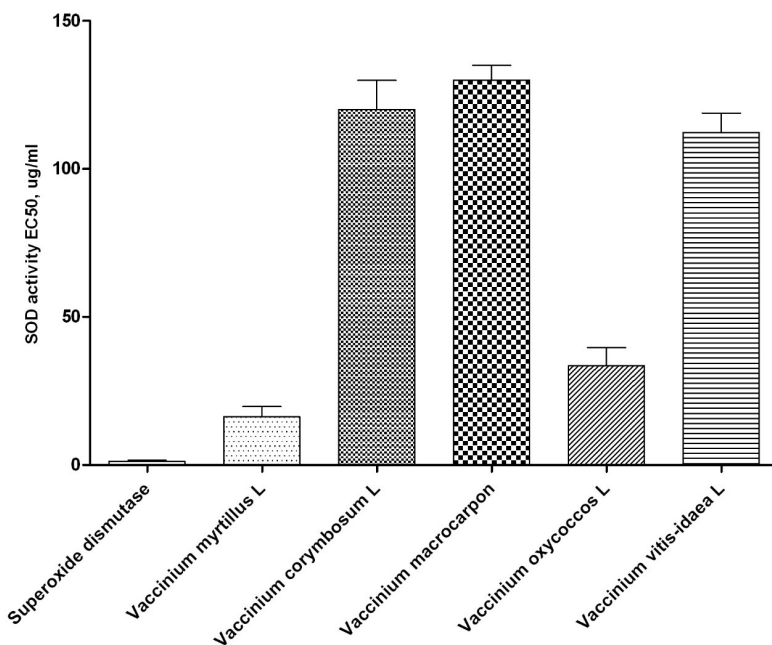


Attēls 3.4.2. Polifenolu daudzuma korelācija ar antioksidatīvo kapacitāti AAE mg/g.

Pīrsona koeficients ir 0,654879, kas norāda uz stipru pozitīvo sakarību. Jo vairāk polifenolu, jo lielāka antioksidatīvā kapacitāte.

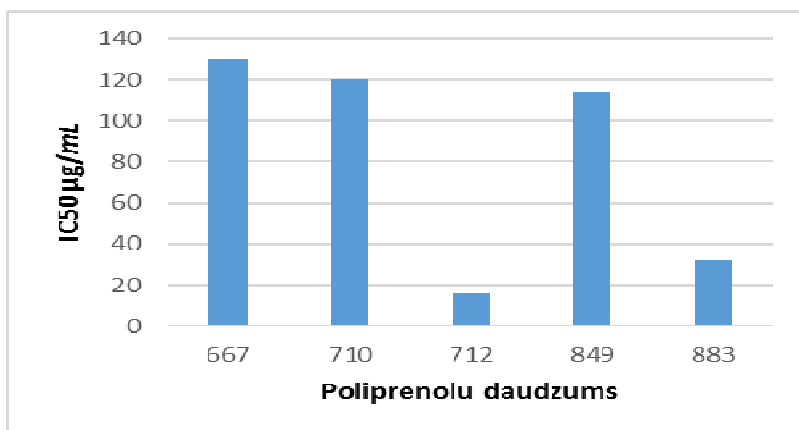
3.5. SOD aktivitāte

Superoksīda dismutāze katalizē superoksīda anjona dismutāciju ūdeņražā peroksīdā un skābeklī. Superoksīda dismutāzei līdzīgu aktivitāti var noteikt izmērot superoksīda anjona samazināšanos pētāmās vielas iespaidā.



Attēls 3.5.1. Ogu ekstraktu superoksīda dismutāzes aktivitāte

Visi ekstrakti izrāda ļoti augstu superoksīda dismutāzei līdzīgu aktivitāti, īpaši augsta aktivitāte ir melleņu un purva dzērveņu ekstraktiem.



Attēls 3.5.1 Polifenolu daudzuma GAE mg/g korelācija ar ekstraktu superoksīda anjonu inhibēšanas IC50.

Pīrsona koeficients ir -0,26364, kas norāda uz vidēji stipru negatīvo sakarību. Jo vairāk polifenolu, jo mazāka ekstraktu koncentrācija vajadzīga superoksīda anjonu inhibēšanai. SOD aktivitāti raksturo superoksīda anjona līmeņa samazināšana.

4. DISKUSIJA

Pētījumā tika salīdzināti piecu dažādu ogu izspiedņu ekstraktu antioksidatīvie efekti *in vitro* testos. Lai varētu izprast ķīmiskā sastāva lomu ekstraktos, vispirms veicām totālo polifenolu un totālo flavonoīdu daudzumu mērījumus. Folino Čikalto reaģents tiek izmantots polifenolu un arī proteīnu daudzuma mērīšanai un metodei ir daudzas modifikācijas. Visbiežāk polifenolu daudzumu mēra gallu skābes ekvivalentos. Polifenoli, ieskaitot flavonoīdus, ir molekulas ar antioksidatīvām īpašībām, tas nozīmē, ka, ja augos ir liels šo molekulu līmenis, tad augam piemīt lielas antioksidatīvas īpašības [Al-Mamary et al., 2002]. Atradām, ka vislielākais totālais fenolu daudzums *Vaccinium spp.* ogu ekstraktos izteikts GSE ir dzērveņu un brūkleņu ekstraktiem. Vismazāk polifenolu atradām lieloģu dzērveņu ekstraktos. Tomēr jāatzīst, ka vidēji polifenolu saturs ir līdzīgs visos pētītajos ogu ekstraktos. Polifenolu koncentrācijas ir no 667 – 849 GAE mg/g. Tomēr šai metodei ir trūkumi. Totālais polifenolu sastāvs, kas ir mērīts ar Folino-Čikalto metodi, var dot kļūdainus rezultātus, jo ir iespējama mijiedarbība ar citiem ķīmiskiem savienojumiem, kas atrodami ekstraktos (cukuri, aromātiskie amīni, sēra dioksīds, askorbīnskābe, organiskās skābes un citas nefenoliskas organiskas substances, kas reaģē ar šo reaģentu [Roura et al., 2006]. Šo fenolisko savienojumu kvantificēšanai būtu nepieciešama augstas precizitātes šķīdumu hromatogrāfija (HPLC). Willdinger un Herrmann 1973. gadā novēroja, ka kvercetinā ir visizteiktākais fenoliskais savienojums mellenē. Papildus kvercetinam, vairākās Eiropas melleņu sugās ir novērojams arī mircetinā un kemferols [Starke et al, 1976]. Lielu daudzumu kvercetinā novēroja arī Hakkinen et al. 1999. gadā, kur kvercetinā bija 21,4% no visiem fenoliskajiem savienojumiem, kas atrodami mellenē.

Totālo flavonoīdu daudzumu ogu ekstraktos mērījām ar kolorimetrisko alumīnija hlorīda un nātrija nitrīta metodi. Šajā metodē visbiežāk izmanto rutīnu un kvercetinā kā standartus un rezultātus izsaka rutīna vai kvercetinā ekvivalentos. Metodes pamatā ir Al jona, flavonu un flavonolu karbonil un hidroksilgrupu reakcija, kuras rezultātā rodas dzeltenas krāsas komplekss. Izsakot rutīna ekvivalentos totālais flavonoīdu daudzums bija no 383 – 851 RE mg/g. Rēķinot pēc rutīna ekvivalenta, mēs atradām augstāku totālo flavonoīdu saturu lieloģu dzērvenēs un krūmmellenēs.

Antioksidantu aktivitāti ogu ekstraktiem pierādījām ar trīs metodēm – totālo antioksidantu spēju, DPPH radikāla koncentrācijas samazināšanas un SOD aktivitātes testiem.

Totālo antioksidantu kapacitāti veido visi ogu ekstraktu summārie antioksidanti. Fitokīmiskie savienojumi, kuri ir atbildīgi par antioksidatīvo kapacitāti, visticamāk, ir fenoliskās skābes, antocianīni un citi flavonoīdu savienojumi [Cao et al., 1997.]. Totālo antioksidantu spēju mērijām ar kolorimetrisko metodi, kurā notiek molibdēna VI fosfāta reducēšana par molibdēna V fosfātu. Askorbīnskābi izmantojām kā references vielu. Askorbīnskābes ekvivalentos atrastā vislielākā antioksidatīvā spēja ir dzērveņu un melleņu ekstraktiem.

DPPH katjoni nav bioloģiski būtiski, taču to aktivitāti analizē, lai noteiktu brīvo radikāļu neutralizēšanas aktivitāti augu ekstraktos [Mayakrishan et al., 2013]. Tie ir indikatoru savienojumi, lai izmēritu udeņraža atdošanas spēju augos. Rezultāti tiek izteikti kā izmaiņas DPPH koncentrācijā, mainoties ekstraktu koncentrācijai. DPPH metode nav sarežģīta, tā ir lēta un pietiekami akurāta, kā arī parāda ekstraktu aktivitāti pret brīvajiem radikāļiem, kuru nodrošina gan antocianīni, gan citi savienojumi, kuri atrodami ogās. Šajā eksperimentā visiem ekstraktiem tika novērota laba DPPH radikāļu neutralizēšanas aktivitāte, IC50 vērtības konstatētas robežās no 0,11 – 0,23 mg/ml. Askorbīnskābei IC50 ir mazāka – 0,094 mg/ml, tomēr dzērveņu un brūkleņu ekstraktiem IC50 statistiski ticami neatšķiras no askorbīnskābes IC50 šajā testā.

Viena no galvenajām flavonoīdu apakšgrupām augļos un ogās ir antocianīni, tie ir atbildīgi par ogu sarkano, violeto un zilo krāsu. Antocianīnus uzskata par vissvarīgāko no farmakoloģiski aktīvajām substancēm ogā [Valeontova et al., 2007]. Veiktajā Valeontova un citi (2007) eksperimentā melleņu ekstraktā tika mērīts antocianidīnu cianidīna, delfinidīna, malvidīna, paeonidīna un petunidīna daudzums, kas ekstraktā sastādīja 35% no visiem flavonoīdiem. Antocianīni, pateicoties to spējai deaktivizēt brīvos radikāļus, ir efektīvi brīvo radikāļu neutralizētāji. Ir plaši zināms un apstiprināts fakts, ka ogas satur lielu daudzumu fenolisko savienojumu, kuriem piemīt antioksidatīvās īpašības. Šis fakts ir guvis apstiprinājumu daudzos pētījumos un iegūtie dati to apstiprina atkārtoti. Tā kā ogu ekstraktu sastāvs ir ļoti sarežģīts, ir grūti noteikt, kuri savienojumi visvairāk ietekmē ogu antioksidatīvās īpašības. Ogas ir bagātas ne tikai ar antocianīniem, bet arī ar dažādiem flavonoīdiem, piemēram, katehīnu, epikatehīnu, mircetīnu, kvercetinū, kemferolu, fenoliskajām skābēm un askorbīnskābi, kuriem arī piemīt brīvo radikāļu neutralizējošas īpašības. Ir novērota DPPH radikāļa inaktivācija atkarībā no laika. Palielinoties laikam, samazinājās arī neutralizēto brīvo radikāļu koncentrācija. Līdzsvars tika saniegts pēc trīsdesmit minūtēm [Sellapan et al., 2002]. Tāpēc arī mēs inkubējām ogu ekstraktus ar DPPH 30 minūtes un pēc tam mērijām atlikušo DPPH koncentrāciju.

Novērots, ka gaismas intensitāte, fotoperiods un temperatūra ietekmē vairāku sekundāro metabolītu biosintēzi [Hohtola, 2007]. Jaakola [et al., 2004] novēroja, ka antocianīnu, katehīnu un flavanolu koncentrācijas augstākas ir augos, kuri bijuši tiešā saules ietekmē. Papildus tam, arī augstums virs jūras līmeņa ir iespējamo izmaiņu veicinošs faktors, jo augiem, kuri aug augstāk par 1500m virs jūras līmeņa, ir lielāks totālais fenolu saturs, nekā augiem, kuri aug zemāk. Jau 1996. gadā Dookozlian un Kliewer izteica domu, ka gaisma augos varētu izraisīt par antocianīnu sintēzi atbildīgo enzīmu aktivitāti. Tāpēc ogu ekstraktu sastāvs būtu jāpēta vairākus gadus, lai atrastu marķieri, kuru izmantot aktivitātes monitoringam. Melleņu ekstrakti ir visvairāk pētītie ogu ekstrakti. Polifenoliskajiem savienojumiem, kuri atrodami mellenēs, varētu būt vairāki veselībai labvēlīgi efekti, kurus ir sarežģīti izprast. Potenciālais augstas antioksidantu kapacitātes un šūnu aizsardzības no brīvo radikāļu uzbrukumiem efekts ir skaidri redzams [Haliwell, 1994], taču citi iespējamie efekti, kas var būt neatkarīgi no antioksidatīvajām īpašībām, nav tik skaidri. Iespējams, ka antocianīniem varētu būt veselībai papildus labvēlīgi efekti neatkarīgi to antioksidatīvajiem efektiem. Vairāki pētījumi, kuros izmantots attīrīts *V. myrtillus* ekstrakts (komerciāli pazīstams ar nosaukumu Myrtocian, kurš satur 36% antocianozīdus), rāda, ka cianidīn-3-glikozīds ir aktīvākais savienojums pret oglekļa tetrahlorīda inducētu lipoperoksidāciju un tam ir visaugstākā brīvo radikāļu neitralizēšanas spēja. Papildu antioksidatīvajai darbībai, Myrtocyan aizkavē vai kontrolē intersticiālā šķidrums veidošanos un palīdz kontrolēt asinsplūsmu mikrovaskulārajā tīklā, promotē brūču dzīšanu, tāpat tam piemīt pretčūlu un aterosklerotiska aktivitāte. [Morazzoni et al., 1996].

Pētījumā Turcijā, kurā tika analizēti vairāki *Vaccinium* grupas augi, *Vaccinium myrtillus* tika novērots vislielākais fenolu saturs, taču šajā pētījumā netika apskatīti *Vaccinium oxycoccus* un *Vaccinium vitis-idaea* izspiedņu ekstrakti, kurus mēs pētījām šajā darbā. Turcijā veiktajā pētījumā tika novērots, ka *Vaccinium corymbosum* ir mazāka DPPH radikāļu neitralizēšanas aktivitāte par *Vaccinium myrtillus*, savukārt iegūtās melleņu DPPH koncentrācijas samazināšanas IC50 vērtība sakrīt ar mūsu iegūtajiem rezultātiem. Tomēr mūsu pētījumā DPPH radikāļa koncentrācijas samazināšanas aktivitāte starp abiem melleņu ekstraktiem neatšķīrās.

Literatūras studijas liecina, ka pētījumos ir salīdzinātas arī dažādas *V. corymbosum* sugas, un vislielākais polifenolu un antocianīnu saturs, kā arī lielākā antioksidatīvā aktivitāte novērota Patriot šķirnei un vislielākais flavonoīdu saturs – Bluejay šķirnei [Saral et al., 2014]. Spriežot pēc ogu totālā polifenolu, antocianīnu, flavonoīdu un antioksidantu

aktivitātes analīžu rezultātiem, meža mellenēm ir lielāka aktivitāte nekā kultivētajām mellenēm. To rāda arī mūsu pētījumā iegūtie dati.

Rumānijā tika pētīti *V. myrtillus* un *V. corymbosum* totālie polifenoli, antocianīni, flavonoīdi un to antioksidatīvās īpašības. Arī šeit tika novērots, ka savvaļā augušajām ogām ir lielāka antioksidatīvā aktivitāte nekā kultivētajām ogām [Bunea et al., 2011]. Itālijā, salīdzinot šīs pašas ogas, iegūti tādi paši rezultāti. Papildus tam novērots, ka Patriot šķirnei ir vislielākā antioksidantu aktivitāte, savukārt tas sakrīt ar pētījuma datiem Turcijā [Giovanelli et al., 2009].

Salīdzinot ar citām *Vaccinium* ogām, vislielākā antioksidantu kapacitāte ir mellenēm. Tomēr starp vairākām analīzēm, kas tika veiktas ar mellenēm, kuras iegūtas no komerciāliem lielveikaliem, bija ievērojamas izmaiņas iegūtajos rezultātos, kas liecina par to, ka atšķiras dažādu *Vaccinium* sugu šķirņu antioksidatīvā kapacitāte [Wang et al., 1996]. Analizējot antocianīnu [Wang et al., 1997] un citu flavonoīdu [Cao et al., 1997] antioksidantu kapacitāti, redzams, ka tiem piemīt divas līdz sešas reizes lielāka antioksidatīvā aktivitāte kā vispazīstamākajiem antioksidantiem, piemēram, askorbātam, glutationam, un citiem. Augstkrūmu mellenēm (*V. corymbosum*) antocianīnu sastāvs ir no 25 mg līdz 495 mg uz 100g [Mazza et al., 1993]. Izmantojot augstas veikspējas šķidrums hromatogrāfiju, noteikts, ka divās dažādās augstkrūmu melleņu sugas ogās antocianīnu sastāvs ir apmēram 100 mg uz 100g [Gao et al., 1994]. Tās ir vienas no melleņu sugām, kuras tiek komerciāli izmantotas Amerikas Savienotajās Valstīs. Mellene, kura nākusi no Eiropas un Āzijas ziemeļu reģioniem, ir ar visaugstāko antocianīnu daudzumu, kas ir 300-698 mg uz 100g [Mazza et al., 1993].

Ogu ekstraktiem superoksīda dismutāzei līdzīgā darbība ir ļoti būtiska, jo ir pierādīts, ka SOD ir daudz plašāka bioloģiskā aktivitāte par superoksīda anjona dismutēšanu. Piemēram, SOD ir pierādīta pretiekaisuma darbība, kas saistīta ar enzīma antioksidatīvo darbību. SOD pārvērš superoksīda anjonu skābeklī un ūdeņraža peroksīdā, kas organismam nav tik bīstami. Tālāk šūnā darbojas katalāze, kas pārvērš ūdeņraža peroksīdu ūdenī un skābeklī. Pierādīts, ka ogu ekstrakti stimulē katalāzes darbību un samazina ūdeņraža peroksīda līmeni. Mēs šajā pētījumā nemērījām ūdeņraža peroksīda līmeņa samazināšanos. Atradām, ka visaktīvāk superoksīda anjonu dismutē pati SOD, taču ogu ekstrakti arī uzrāda augstu SOD-līdzīgu efektu. Visaktīvākie ir melleņu un purva dzērveņu ekstrakti.

5. SECINĀJUMI

1. Piecu *Vaccinium spp.* ogu spiedatlieku ekstraktu polifenolu saturs gallu skābes ekvivalentos parāda augstu polifenolu līmeni no lielogu dzērveņu 667 līdz purva dzērveņu 883 GSE mg uz g ekstrakta. Melleņu un krūmmelleņu polifenolu saturs ir līdzīgs, attiecīgi 712 un 710 GSE mg/g.
2. Ogu ekstraktu totālo flavonoīdu saturs norāda uz to, ka šajos ekstraktos lielākā polifenolu sastāvdaļa ir flavonoīdi. Totālo flavonoīdu saturs rāda flavonoīdu līmeņu rindu: lielogu dzērvenes>krūmmellenes>mellenes>purva dzērvenes>brūklenes.
3. Vislielākā totālā antioksidantu aktivitāte izteikta askorbīnskābes ekvivalentos ir purva dzērvenei un mellenei, mazāka ir lielajai dzērvenei un krūmmellenei.
4. Dzērveņu un brūkleņu ekstraktu DPPH koncentrācijas samazināšanas spēja ir līdzīga askorbīnskābei, bet melleņu un krūmmelleņu ekstraktiem ir vājāka un IC50 atšķiras no askorbīnskābes IC50.
5. Visi ekstrakti izrāda ļoti augstu superoksīda dismutāzei līdzīgu aktivitāti, kas mērāma ED50 koncentrācijā µg/ml. Īpaši augsta aktivitāte ir melleņu un purva dzērveņu ekstraktiem. No minētajiem antioksidantu testiem ogu ekstraktiem vislielākā antioksidantu spēja novērota superoksīda dismutāzes aktivitātes testā.
6. Atrasta augsta pozitīva korelācija starp ogu ekstraktu polifenolu saturu un totālo antioksidantu kapacitāti, kas parāda, ka pieaugot polifenolu saturam, pieaug antioksidatīvā spēja. Atrasta vidēji stipri negatīva sakarība ar DPPH un superoksīda anjona koncentrācijas samazināšanas spēju, kas parāda, ka pieaugot ekstraktu polifenolu saturam vajadzīga mazāka ekstraktu koncentrācija, lai inhibētu brīvo radikāļu līmeni.

6. PATEICĪBAS

Projekta 1.1.1.1/16/A/047 Vaccinium ģints ogu pārstrāde: "zaļās" tehnoloģijas un inovatīvi, farmakoloģiski raksturoti produkti biofarmācijai" ar ERAF līdzfinansējumu atbalstam.

Pētniekam Kasparam Jēkabsonam par palīdzību ogu ekstraktu SOD aktivitātes pētījumā.

Darba vadītājai Rutai Muceniecei par pacietību, pretimnākšanu visdažādākajos jautājumos un iespēju izstrādāt maģistra darbu.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Al-Mamary M., Al-Meerī A., Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Research*. 2002; 22: 1041-1047.
2. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 109: 33-44.
3. Bendich A. Antioxidant micronutrients and immune responses. *NY Academy of Sciences*. 1990; 175.
4. Bendich A., Olson J. A. Biological actions of carotenoids. *FASEB J*. 1998; 3: 1927-1932.
5. Benzie I.F.F. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003; 136(1): 113-126.
6. Boxin O.U., Deijan H., Maureen A.F., Elizabeth K.D. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A comparative study. *J Agric Food Chem*. 2002; 5: 223-228.
7. Briviba K., Fraser G., Sies H., Ketter B. Distribution of the monochlorobimamne-glutathione conjugate between nucleus and cytosol in isolated hepatocytes. *Biochem J*. 1993; 294: 631-633.
8. Bunea A., Rugina D. O., et al. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2011; 39(2): 70-76.
9. Burch PM., Heintz HH. Redox Regulation of Cell-cycle Re-entry: Cyclin D1 as a Primary Target for the Mitogenic Effects of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Antioxidants & redox Signaling*. 2005; 7: 741-751.
10. Burhans W., Heintz N. The Cell Cycle is a Redox Cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009; 47: 1282-1294.
11. Cadenas E., Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 222-230.
12. Camera E., Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J of Chromatography*. 2002; 781: 181-206.

13. Cao G. H., Russell R. M., Lischner N., Prior R. L. Serum Antioxidant Capacity is increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or Vitamin C in Elderly Women. *J Nutri.* 1998; 128: 2383-2390.
14. Carlsen M. H., Halvorsen B. L., Holte K., et. al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J.* 2010; 9: 1-11.
15. Chen Z. Research of anti-oxidative capacity in essential oils of plants. *China Conditions.* 2008; 11: 40-43.
16. Chu Y. F., Liu R. H. Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDL receptor expression in hepatocytes. *Life Sci.* 2005; 77: 1892-1901.
17. Cook N. C., Samman S. Review: flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 1996; 2(7): 66-76.
18. Curran J. E., et. al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genetic.* 2005; 37: 1234-41.
19. Dembinska-Kiec A., Mykannen A., Mykannene H., Kiec-Wilk A. Antioxidant Phyto-chemicals against Type 2 Diabetes. *British J Nutri.* 2008; 99: 109-117.
20. Deyhim F., Patil B.S., Villarreal A., et. al. Cranberry juices increases antioxidant status without affecting cholesterol homeostasis in orchidectomized rats. *J Med Food.* 2007; 10: 49-53.
21. Dolas Ashadevil S., Gotmare S.R. The health benefits and risk of Antioxidants. *Pharmacophore.* 2015; 6: 25-30.
22. Dokoozlian N. K., Kliwer W. M. Influence of light on grape berry growth and composition varies during fruit development. *J Am Soc Hort Sci.* 1996; 121: 869-874.
23. Duthie G.G., Brown K.M. Reducing the Risk of Cardiovascular Disease, In: *functional Foods.* Goldsberg Chapman. 1994; 2: 19-38.
24. El-Benna J., Dang PM., Gougerot-Pocidal MA., Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp.* 2005; 53: 199-206.
25. Gaby S. K., Singh V. N. Vitamin intake and health: A Scientific Review. 1991
26. Giovanelli G., Buratti S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chem.* 2009; 112: 903-908.

27. Gomes F.S., Costa P.A., Campos M.B.D., Tonon R.V., et. al. Watermelon Juice Pre- treatment with Microfiltration Process for Obtaining Lycopene. *International J of Food Sci and Technol.* 2013; 48: 601-608.
28. Hakkinen S., Heinonen M., et al. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research Internat.* 1999; 32: 345-353.
29. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry.* 2006; 97(6): 1634-1658.
30. Halliwell B., Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed.). Clarendon Press. 1989; Oxford, UK.
31. Halvorsen B. L., Holte K., Myhrstad M.C.W., et. al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutrition.* 2002; 132: 461-471.
32. Hancock JT., Desikan R., Neill SJ. Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways. *Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification.* 2001; 29(2): 345-350.
33. Heinonen I. M., Meyer A. S., Fankel E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J of Agricult and Food Chem.* 1998; 46(10): 4107-4112.
34. Hohtola A. Northern plants as a source of bioactive products. In *Taulavuori. Res. Signpost India*, 2007; 291-307.
35. Hollman P. C. H., van Trijp J. M. P., et. al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters.* 1997; 418(2): 152-156.
36. Ivanov I., Saam J., Kuhn H., Holzhutter HG. Dual role of oxygen during lipoxygenase reactions. *FEBS J.* 2005; 272: 2523-2535.
37. Jaakola L., Maatta-Riihinen K., et al. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry leaves. *Planta*; 218: 721-728.
38. Jones DP. Redox Potential of GSH/GSSG Couple: Assay and Biological Significance. *Methods of Enzymology.* 2000; 348: 93-112.
39. Kagen V.E. Dihydrolipoic Acid - A universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. *Biochem Pharmacology.* 1992; 44: 1637-1647.
40. Kalcher K., Svancara I., Buzuk M., et. al. Electrochemical sensors and biosensors based on heterogeneous carbon materials. *Monatsh Chem.* 2009; 140: 861-889.

41. Kalt W., Hanneken A., Milbury P., Tremblay F. Recent research on polyphenolics in vision and eye health. *J of Agric and Food Chem.* 2010; 58(7): 4001-4007.
42. Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., et. al. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agric and Food Chem.* 2003; 51(1): 68-75.
43. Kelly E. H., Anthony R. T., Dennis J. B. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism, and structure activity relationships. *Nutritional Biochem.* 2002; 10(13): 572-584.
44. Kerr S., Brosnan MJ., McIntyre M., Reid JL., Dominiczak AF., et. al. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension.* 1999; 33: 1353-1358.
45. Klebanoff S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77: 598-625.
46. Koen B., Ruth V., et. al. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry.* 2005; 7(280): 5636-5645
47. Kratchanova M., Denev P., et. al. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochim Pol.* 2010; 57: 229-234.
48. Krikorian R., Shidler M. D., Nash T. A., et. al. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J of Agric and Food Chem.* 2010; 58(7): 3996-4000.
49. Kundu K., Knight S.F., Willet N., et. al. Hydrocyanines: A class of fluorescent sensors that can image reactive oxygen species in cell culture, tissue, and in vivo. *Angew Chem Int.* 2009; 48: 299-303.
50. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 181-189.
51. Latella L., Sacco A., Pajalunga D., Tianen M., Macera D., D'Angelo M., et. al. Reconstitution of Cyclin D1-associated Kinase Activity Drives Terminally Differentiated Cells into the Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology.* 2001; 21: 5631-5643.

52. Li W., Hydamaka A. W., et al. Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Cent Eur J Biol.* 2009; 4: 499-506.
53. Litescu S.C. Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Environ Biosensors.* 2011; 1: 35-40.
54. Lopez M., Martinez F., Del Valle C., et. al. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *J of Chromatography.* 2001; 1(922): 359-363.
55. Martineau L. C., Couture A., Spoor D., et. al. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium*. *Phytomedicine.* 2006; 13(9-10): 612-623.
56. Mayakrishnan V., Veluswamy S., et al. Free radical scavenging potential of *Lagenaria siceraria* fruit extracts. *Asian Pac J Trop Med.* 2013; 6: 20-26.
57. Mazza G., Miniati E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. CRC Press. 1993; 362.
58. McKay D. L., Blumberg J. B. Cranberries and cardiovascular disease risk factors. *Nutr Rev.* 2007; 65: 490-502.
59. McKenzie R.C., Rafferty T.S., Beckett G.J. Selenium: an essential element for immune function. *Immunology Today.* 1998; 19: 342-45.
60. Morazonni P., Bombardelli E. *Vaccinium myrtillus* L. *Fito-terapia.* 1996; 67: 3-29.
61. Morrow J.D., Hill K.E., Nammour T.M., Badr B.K., Roberts L.J. A Series of Prostaglandin F₂-like Compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 9383-9387.
62. Muchuweti M., Kativu E., et. al. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American J Food Tech.* 2007; 2: 414-420.
63. Nem Rajesh K., et. al. Antioxidant - A review. *J Chemical and Pharmaceutical Research.* 2009; 1: 102-104.
64. Novelli S. Developments in berry production and use. *Agriculture and Foods Can.* 2003; 16(21): 5-6.
65. Ogawa K., Shakikabara H., et al. Anthocyanin composition and antioxidant activity of crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *J Agric Food Chem.* 2008; 56: 4457-4462.

66. Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Comm.* 1999; 266: 690-698.
67. Orient A., Doniko A., Leto TL., Gelszt M. Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 1281-1288.
68. Ozsy N., Candoken E., Akev N. Implications for degenerative disorders: anti oxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in aloe vera. *Oxid Medicine Cell Long.* 2009; 2: 99-106.
69. Pap E.H., Drummen G.P., Post J.A., Rijken P.J., Wirtz K.W., Fluorescent Fatty Acid Monitor Oxygen in Single cells. *Methods Enzymol.* 2000; 319: 603-612.
70. Pavia S.A., Russell R.M. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J American Coll Nutrition.* 1999; 18: 426-433.
71. Pereira M.C., Steffens R.S., Jablonski A., Hertz P.F., Rios A.D., Vizzotto M. Characterization, Bioactive Compounds and Antioxidant Potential of Three Brazilian Fruits. *J Food Composition and Analysis.* 2013; 29: 19-24.
72. Peter F.S. Natural Antioxidants in Poultry Nutrition: New Developments. *Poultry Nutrition.* 2007; 16: 669-676.
73. Prior R. L., Cao G., Martin A., et. al. Antioxidant capacity is influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *vaccinium* species. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 2686-2693.
74. Pryor WA., Stanley JP., Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A Suggested mechanism for the Formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like Endoperoxides. *Lipids.* 1976; 11: 370-379.
75. Ramadan-Hassanien M.F. Total antioxidant potential of juices, beverages and hot drings consumed in Egypt screened by DPPH in vitro assay. *Hrasas Yaceites.* 2008; 59: 254-259.
76. Rath M. Eradicating heart disease. *Health Now.* 1993.
77. Rice-Evans C. A., Miller N. J., et. al. The relative antioxidant activities of plant-derived polypenolic flavonoids. *Free Radical Research.* 1995; 4(22): 375-383.
78. Roberts L.J., Morrow J.D. Measurment of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 170-180.
79. Roura E., Andres-Lacueva C., et al. Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urine. *Clinical Chem.* 2006; 52: 749-752.

80. Saikat S., Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society. 2001; 1: 28-33.
81. Salim A. A., Chin Y. W., Kinghorn A. D. Drug discovery from plants. Springer. 2008; 1-18.
82. Scalbert A., Manach C., Morden C., et. al. Dietary polyphenols and prevention of diseases. Critical Review of Food Sci Nutri. 2005; 45: 287-306.
83. Seeram N. P. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. J of Agric and Food Chem. 2008; 56(3): 627-629.
84. Sellapan S., Akoh C.C., Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. J Agric Food Chem. 2002; 50(8): 2432-2438.
85. Sen S., Chakraborty R., et. al. Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current. Int J Pharma Sci Rev Res. 2010; 3: 91-100.
86. Shmueli H., Yahav J., Samra Z., et. al. Effect of cranberry juice on eradication of Helicobacter pylori in patients treated with antibiotics and a proton pump inhibitor. Mol Nutr Food Res. 2007; 51: 746-751.
87. Sies H. Antioxidant Function of Vitamins. Ann NY Academic Sci. 1992; 669: 7-20.
88. Simon J.A., Hudes E.S., Tice J.A. Relation of Serum Ascorbic Acid to Mortality among Adults. J American Col Nutrition. 2001; 20: 255-263.
89. Sin H.P.Y., Liu D.T.L., Lam D.S.C. Life style Modification, Nutritional and Vitamins Supplements for Age-Related Macular Degeneration. Acta Ophthalmologica. 2013; 91: 6-11.
90. Skupien K., Oszmianski J., et. al. In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. Cancer Lett. 2006; 236: 282-291.
91. Starke H., Herrmann K. The phenolics of fruits, VIII. Changes of flavonol concentrations during fruit development. 1976. 299: 161; 131-135.
92. Suttle N. F. Mineral Nutrition of Livestock. MPG. 2010; 4: 565.
93. Takeshita M., Ishida Y., Akamatsu E., et. al. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic Hepatitis C Virus RNA. J Biol Chem. 2009; 284: 21165-21176.

94. Tarpley M.M., Fridovich I. Methods of Detection of Vascular Reactive Species. *Circulation Research*. 2001; 89: 224-236.
95. Tarpley MM., Wink DA., Grisham MB. Methods for detection of reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol*. 2004; 286: 431-444.
96. Tripoli E., Guardia M. L., et. al. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chem*. 2007; 2(104): 466-479.
97. Valeontova K., Ulrichova L., et al. Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes. *Food Chem*. 2007; 101: 912-917.
98. Vita J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American J Clinical Nutrition*. 2005; 81: 292-307.
99. Vivek K.G., Surendra K.S. Plants as natural antioxidants. *Natural Production Radia*. 2006; 5: 326-334.
100. Vorbach C., Harrison R., Capecchi MR. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol*. 2003; 24: 512-517.
101. Wang H., Cao G., Prior R. L. Oxygen Radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem*. 1997; 45: 304-309.
102. Wang H., Cao G., Prior R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem*. 1996; 44: 701-705.
103. Wildanger W., Hermann K. The phenolics of fruits, II. The flavonols of fruits. 1973. 151; 103-108.
104. Wilson T., Singh A. P., Vorsa N., et. al. Human glycemic response and phenolic content of unsweetened cranberry juice. *J Med Food*. 2008; 11: 46-54.
105. Young A.J., Low G.M. Antioxidant and pro-oxidant properties of carotenoids. *Arch Biochemistry and Biophysics*. 2001; 385: 20-27.
106. Zielonk J., Vasquez-Vivar J. J., Kalyanaraman B. Detection of 2-hydroxyethidium in Cellular Systems: a Unique Marker Product of Superoxide and Hydroethidine. *Nature Protocols*. 2008; 3(1): 8-21.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs “Vaccinium spp. ogu ekstraktu polifenolu saturs un antioksidatīvie efekti” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Reinis Rembergs_____.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Profesore Dr. hab. biol. Ruta Muceniece_____.

Recenzents: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____

(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____

(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____2018., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____.