

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS PROGRAMMA

**Lunasīna biostabilitāte un citotoksicitāte in  
vitro testos**

BAKALURA DARBS

Autors: Jaroslavs Matvejevs

Stud. Apl. Jm09053

Darba vadītāja: profesore Dr. hab. biol.

Ruta Muceniece

RĪGA 2012

## Anotācija

Funkcionālā pārtika satur bioloģiski aktīvas vielas ar pierādītu ietekmi uz kādas slimības riska faktoriem. Pārtikas proteīni paši var kalpot kā profilakses līdzekļi, bet papildus tiem enzimatiski sašķeļoties veidojas bioloģiski aktīvi peptīdi. Vispirms sojā, bet pēc tam rudzos, kviešos, miežos un tritikālē atklātais 43 aminoskābju garš peptīds lunasīns spēj preventēt, inhibēt un apstādināt vēža šūnu augšanu, samazināt zema blīvuma lipoproteīnu līmeni asinīs, un tam piemīt pretiekaisuma aktivitāte.

Šī pētījuma mērķis bija izstrādāt lunasīna noteikšanas ELISA metodi un noteikt lunasīna biostabilitāti peļu audos, kā arī pārbaudīt lunasīna citotoksicitāti normālās un cilvēka vēža šūnu līnijās. Iegūtie dati liecina, ka ar ELISA metodi var noteikt lunasīnu koncentrācijā no 20 līdz 120 ng/ml. Pārbaudot lunasīna atgūstamību peļu audu homogenātos, atklājām, ka ar graudu saturošu pārtiku barotām pelēm lunasīns akumulējās nierēs. Lunasīns uzrādīja toksicitāti eksperimentā PA1 un SH-SY5Y šūnu līnijās.

Atslēgvārdi: Lunasīns, ELISA, atgūstamība, vēža šūnu līnijas.

## **Annotation**

Functional foods contain biologically active substances with a preventative effect on a disease risk factors. Food proteins themselves and enzymatically formed biologically active peptides can serve as a prophylactic means. First of all in soy, then in rye, wheat, barley and triticale the 43 amino acid long peptide lunasin with anti-inflammatory action and ability to prevent proliferation and growth of cancer cells was found. Later it was shown that lunasin reduces level of low-density lipoproteins in the blood. This study aimed to develop ELISA method for measurement of lunasin content and to determine biostability of lunasin in mouse tissues as well as to test lunasin cytotoxicity in normal and human cancer cell lines. The obtained data show that with the ELISA assay one can detect lunasin at concentration from 20 to 120 ng / ml. We found that lunasin accumulates in kidney and brain of the grain-based food fed mice. Lunasin showed no toxicity to human cancer cell lines used in the experiments.

Key words: lunasin, ELISA, recovery, cancer cell lines.

## SATURS

IEVADS .....	4
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	6
1.1. Peptīds lunasīns un tā atklāšanas vēsture.....	6
1.2. <i>Glycine max</i> un tājā saturošas funkcionālās vielas .....	10
1.3. Lunasīns augos un komerciāli pieejamos produktos .....	11
1.4. Lunasīna iegūšana iespējas .....	15
1.5. Lunasīna biopieejamība .....	16
1.6. Lunasīna farmakoloģiskie efekti.....	18
1.7. Lunasīna kombinācija ar aspirīnu .....	20
1.8. Lunasīna pretvēža darbības molekulārie mehānismi. ....	21
2. MATERIĀLI UN METODES.....	24
2.1. Materiāli .....	24
2.2. Aparatūra .....	25
2.3. Lunasīna kvantitatīvās noteikšanas ELISA metodes izstrādāšana.....	25
2.4. Lunasīna koncentrācijas mērīšana peļu audu homogenātos .....	26
2.6. Lunasīna citotoksicitātes noteikšana ar MTT metodi .....	27
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	29
3.1. Lunasīna kvantitatīvās noteikšanas ELISA metodes modifikācija.....	29
3.2. Lunasīna biostabilitāte peļu audu homogenātos .....	30
3.3. Lunasīna citotoksiskie efekti cilvēka šūnu līnijās.....	31
SECINĀJUMI .....	35
PATEICĪBAS .....	36
IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI.....	37
Pielikums 1 .....	44
Pielikums 2 .....	46

## IEVADS

Soja ir pazīstama jau vairāk nekā 5000 gadu. To ilgu laiku lieto gan pārtikā, gan medicīnā. Tagad sojai no jauna ir pievērsta uzmanība, jo pašlaik tā tiek aktīvi pētīta kā funkcionālā pārtika. Par funkcionālo pārtiku var saukt jebkuru augu valsts izcelsmes produktu, kas pozitīvi ietekmē cilvēka veselību. Funkcionālās pārtikas izpēte un informācijas izplatīšana ir ļoti būtiska. Izpētot augu valsts „zāles”, mēs paplašinām zināšanas par slimības mehānismiem un to vāji izprotamiem punktiem, pietuvinām jauno zāļu vielu un darbības principu atklāšanu. Un arī pasargājam sevi no slimībām un vides kaitīgiem faktoriem uzņemot veselīgu un funkcionālu pārtiku.

Lunasīns ir 43 aminoskābju garš peptīds, kas pirmoreiz tika atklāts sojas pupās (*Glycine max*). To atklāja Alfredo De Lumen ASV 1996 gadā. Atklājums bija izdarīts nejauši, bet tas veicināja pēdējo gadu laikā intensīvu šī peptīda izpēti. Atklāja, ka lunasīnam piemīt pretkancerogēnas (1), holesterīnu pazeminošas (2) un pretiekaisuma īpašības (3). Ņemot vērā vēža izplatību pasaulē, funkcionālais uzturs ar profilaktiskām pretvēža īpašībām ir ļoti perspektīvs pētījumu virziens. Lunasīns ir atrasts arī citos pārtikā plaši izmantotos augos: miežos, rudzos, kviešos un nesen mēs atklājām lunasīnu arī tritikālē. Lunasīnu sintezēt ir pārāk dārgi, tāpēc pētījumos izmanto no augiem ekstrahētu lunasīnu. Pēdējā laikā ir publicēti vairāki raksti par lunasīna frakciju izolēšanu no augiem un rekombinētā lunasīna iegūšanu (5, 6, 7).

**Darba mērķis:** izstrādāt ELISA metodi kvantitatīvai lunasīna noteikšanai un to izmantot lunasīna biostabilitātes un citotoksicitātes pētījumiem.

### **Darba uzdevumi:**

1. Izmantojot poliklonālās lunasīna antivielas, izstrādāt enzīm-saistīto imunosorbentmetodi (Enzyme-linked immunosorbent *assay* (*ELISA*)) lunasīna satura mērījumiem.
2. Noteikt lunasīna biostabilitāti peļu audu homogenātos un uzkrāšanos orgānos.
3. Noskaidrot lunasīna citotoksicitāti cilvēka vēža šūnu līnijās, kontrolei izmantojot normālas šūnas.

Lunasīna metode izstrādāta un lunasīna satura pētījumi veikti Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē farmācijas programmā sadarbībā ar Farmakoloģijas katedras pētniekiem.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Peptīds lunasīns un tā atklāšanas vēsture

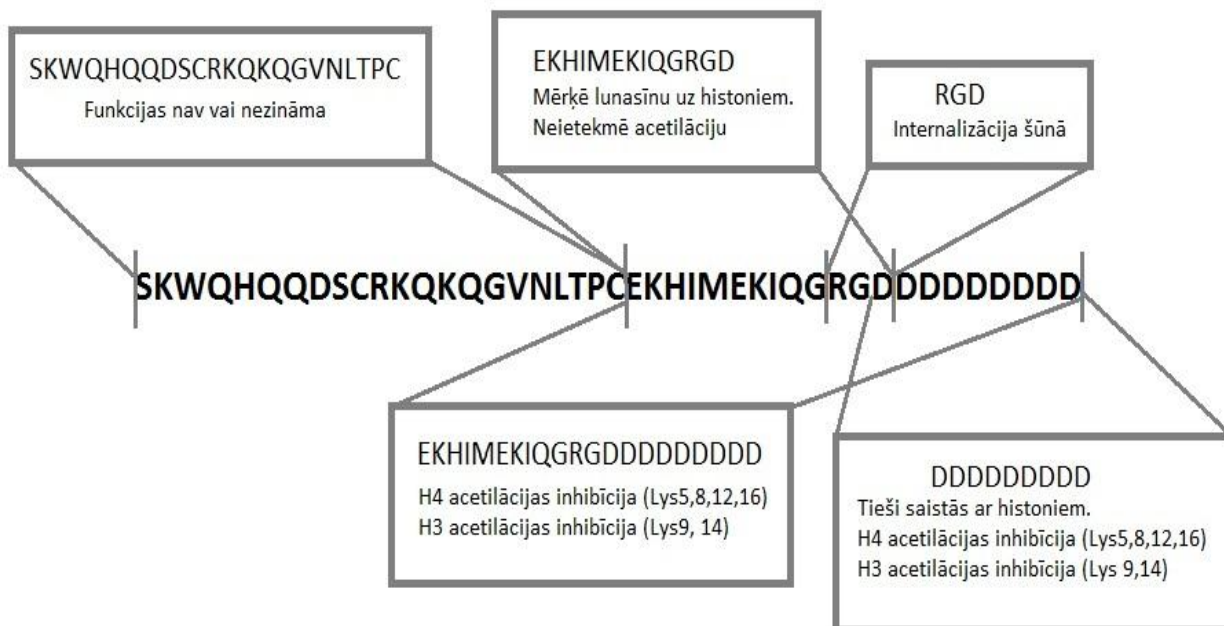
1996. gadā, kad Dr. Alfredo Galvez strādāja pie sojas proteīnu uztura īpašību uzlabošanas Dr. de Lumen's UC Berkeley laboratorijā, viņš nejauši atklāja lunasīnu. Dr. Galvez ar bioinženērijas palīdzību mēģināja ievietot sojas DNS papildus *GM2S-1* ģēnu, kas kā sākotnēji bija domāts kodē ar metionīnu bagātu proteīnu sintēzi. Pēc veiksmīga eksperimenta izrādījās ka šis gēns kodē vēl 3 vielas: signāla peptīdu, lunasīnu un savienotāj-peptīdu (*linker peptide*) (1, 8). Pēc šī eksperimenta lunasīnu pirmo reizi izdalīja no sojas pupām (*Glycine Max*) (8).

Sojas lietošana pārtikā epidemioloģiskajos pētījumos tiek saistīta ar zemu mirstību no prostatas, krūts, resnās zarnas, endometrija vēža un citiem vēža veidiem (1). Tā piemēram dienvidaustrumu Āzijā, kur racionis ir izteikti bagāts ar sojas produktiem, ir 4 līdz 10 reizes zemāks mirstības risks no krūts vai prostatas vēža. Mainoties diētai strauji mainās arī saslimstība ar vēzi. Pētījumi parāda, ka sojas proteīna lietošana pārtikā Āzijā vidēji ir no 10 g/dienā, Ķīnā 30 g/dienā, Japānā un Taivānā 50 g/d (1). Cilvēki, kas ēd ar fitosteroniem bagātu pārtiku, piemēram, soju, retāk mirst no krūts vēža. Sojas produkti satur dažādas funkcionālās vielas un veido spēcīgu aizsardzību pret krūts vēža iniciāciju, promociju un/vai progresu. Šo vielu skaitā ir izoflavoni, saponīni, fenolskābes, fitoteroli, proteāžu inhibitori, bioaktīvie proteīni un peptīdi (9).

Ņemot vērā sojas lietošanas pārtikā un vēža saslimstības epidemioloģiskos datus, pirmajos jaunatklātā peptīda lunasīna pētījumos pārbaudīja tieši tā antikancerogēnās īpašības. A. Galvez, transfektējot ar lunasīna gēnu zīdītāju šūnas, pamanīja, ka tam ekspresējoties šūnās tiek pārtraukta mitoze, rodas hromosomālā fragmentācija un apoptoze. Izrādījās, ka peptīdam piemīta spējas apstādināt šūnas dalīšanās ciklu, saistoties ar hipoacetilētiem histoniem (10). Šīs īpašības dēļ peptīdu nosauca par lunasīnu no vārda „Lunas” kas nozīmē zāles (*cure*) (11).

Turpmākajos pētījumos Dr. Galvez parādīja, ka lunasīns ir sojas 2S albumīna (Gm2S-1) sīka subvienība (11) un, ka, izņemot antikancerogēno efektu, tas uzrāda arī holesterīna pazeminošas īpašības (2), un 2008 gadā viņš publicēja atklājumu, ka jaunatklātajam peptīdam piemīt arī pretiekaisuma efekts (3).

Lunasīna molekula sastāv no 43 aminoskābēm: **SKWQHQQDSCRKQKQGVLNTPCEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD** (4, 7). Šo struktūru var sadalīt pēc funkcionalitātes atsevišķās daļās.

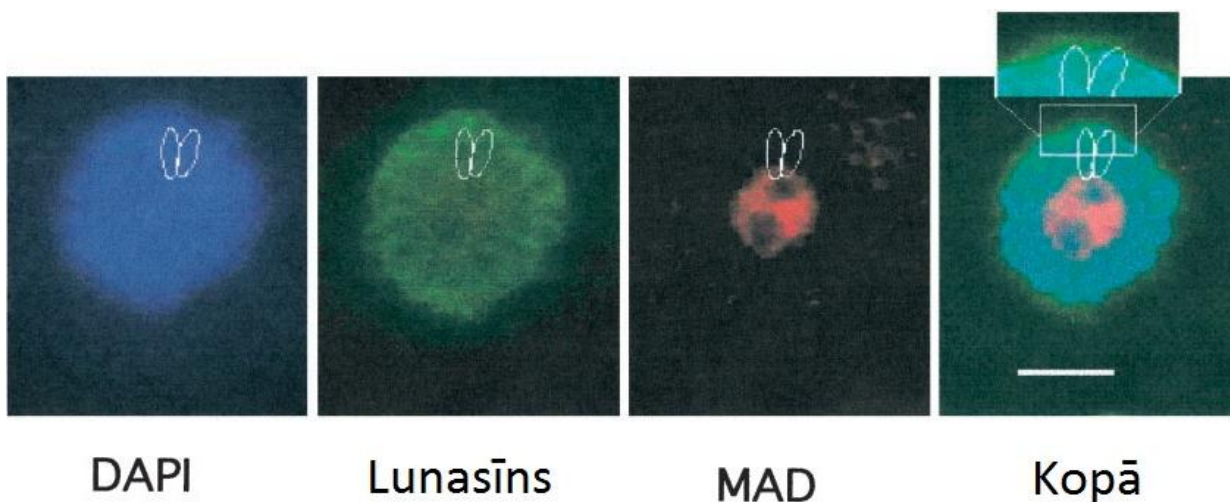


### 1.1 att. 43 aminoskābju garas lunasīna molekulas funkcionālās daļas.

Pateicoties poli-D (asparģīnskābes) molekulas astei, kurai piemīt negatīvs lādiņš, lunasīns saistās pie pozitīvi lādētiem (deacetilētiem) histoniem, kas atrodas kondensētā hromatīna nukleosomās (1). Saistījies tas preventē histonu acetilāciju, bloķējot gēnu transkripcijas aktivitāti (11). Tas notiek tāpēc, ka DNS ir negatīvi lādēts polimērs un histoniem acetilējoties arī parādās negatīvs lādiņš, kā rezultātā DNS un histoni savstarpēji atgrūžas un brīvai DNS var notikt transkripcija. Lunasīns lielākā mērā saistās ar kondensēto hromatīnu pie centromēru kinetohorās (mitozes laikā), un telomērās daļas, jo šie reģioni satur vairāk deacetilēto histonu. Centromērā lunasīns neļauj notikt kinetohoru proteīnu piesaistei centromērām, ieņemot sasistīšanas vietu pie kinetohoras, tādējādi bloķējot mikrotubuļu piesaisti hromosomai. Tas izraisa mitozes arestu un šūnas nāvi (1, 10, 11).

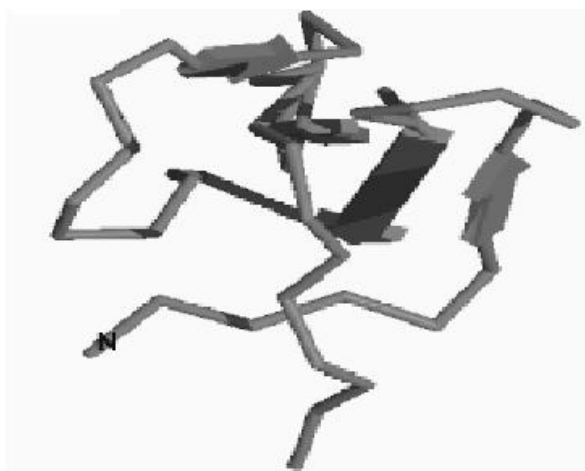
RGD motīvs nav raksturīgs tikai lunasīnam, šis īsais motīvs nosaka molekulas piesaisti vēža šūnas ekstracelulāram matriksam (10, 12). Lielākoties peptīdi, kam piemīt šis motīvs, preventē vēža šūnu metastazēšanos, kas ir saistīta ar to konkurējošo piesaisti ekstracelulāram matriksam (13). Šis tripeptīds ir šūnu adhēzijas saits, kuru atpazīst integrīni (šūnu adhēzijas un internalizācijas receptori), kas atrodas ekstracelulārajā matriksā un šūnu virsmas proteīni (12). Kopumā pašiem RGD tripeptīdiem piemīt spēja aktivēt apoptozi dažādās šūnu līnijās kaspāžu-atkarīgo ceļu stimulēšanas dēļ (14, 15). RGD arī spēj izraisīt citotoksicitāti pilnīgi

transformētās cilvēku vēža šūnu līnijās, arī HL 60 cilvēku leukēmijas šūnās (14). Tieši RGD motīvs lunasīnam nodrošina internalizāciju C3H10T1/2 peļu mezenhīmas šūnu kodolos, bet pretstatā internalizācijai NIH3T3 peļu fibroblastu šūnās tas pilnīgi nav nepieciešams (16). Tas izsaka, ka RGD motīva loma ir specifiska šūnu tipiem. Lunasīns internalizējas šūnās dažu minūšu laikā un jau pēc 18 stundām ir atrodams šūnu kodolos (1.2. att) (17).



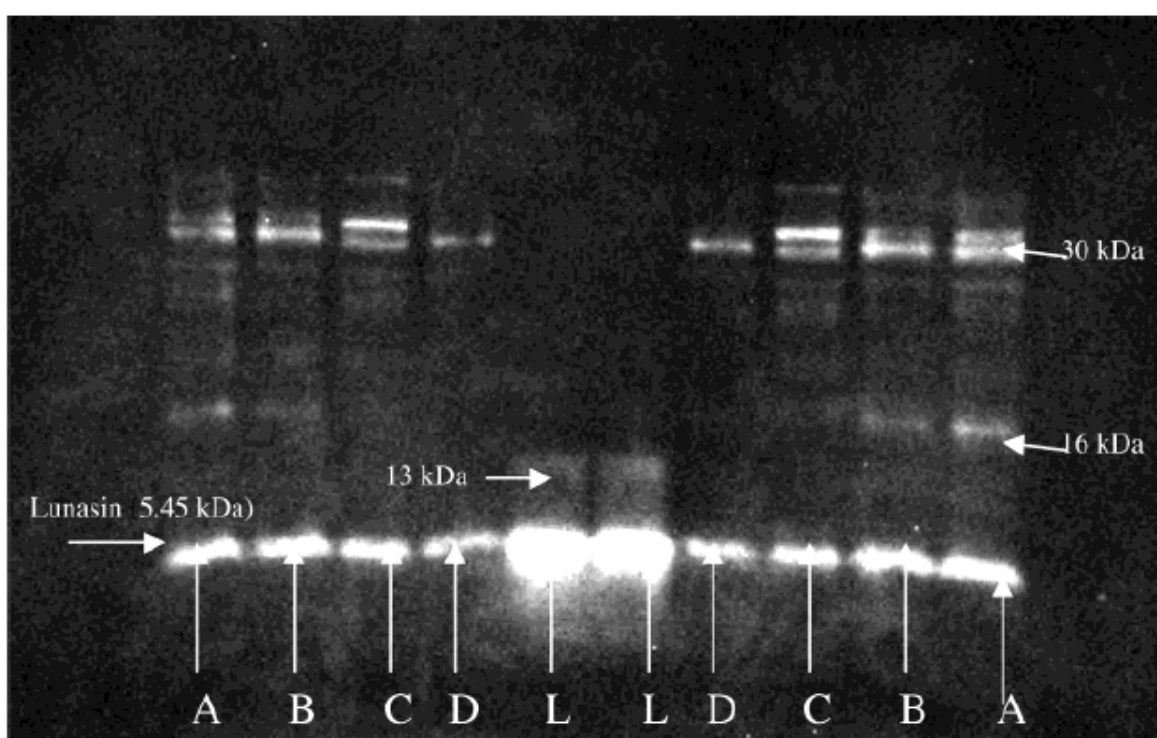
1.2.att. Lunasīna atrašanās C3H 10T1/2 šūnu kodolā. DAPI kodola iezīme (zils krāsojums) attēlo kodola hromosomas, Lunasīna fluorescentā izmunizēšana (zaļš krāsojums), MAD (sarkans krāsojums) šūnas cikla *checkpoint* proteīna iezīme. „Kopā” attēlots lunasīns saitījies pie telomērām metafāzes laikā (16).

Peptīda prognozējamā otrējā struktūra ir redzama 1.4. attēlā (18). Uzska, ka helicēm piemīt homoloģija ar noteiktu reģionu hromafīna saistošo proteīnu – histonu struktūrā (16). Peptīds ir ļoti termoizturīgs. Tas saglabā sākotnējo bioaktivitāti pat pēc 5 min vārīšanas 100°C (1).



1.3. att. Iespējamā lunasīna otrējā struktūra.

Lunasīna peptīds var veidot dimērus, trimērus un heksamērus, bet pagaidām šī parādība nav līdz galam izpētīta (19, 20). Attēlā 1.4. redzams, ka tīrs lunasīns uzrāda gēlā 2 joslas, vienu pie 5,45 kDa un vienu pie 13 kDa, kas nav uzskatāma par lunasīnu, bet par piemaisījumu, kas var saistīties ar lunasīna poliklonālajām antivielām. Hidrolizēts proteīns un izolāts arī parāda joslu virs 5,45 kDa. Zinātnieki pieļauj, ka 16 kDa varētu atbilst lunasīna trimēram. Ja pieturētos pie šīs hipotēzes, tad 30 kDa josla varētu atbilst lunasīna heksamēram. Pagaidām šie secinājumi ir teorētiski un peptīdu mijiedarbības daba tiek pētīta (19). 2010. gadā, pētot lunasīnu miežos, pētnieki sastapās ar iespējamu lunasīna dimēru 9 kDa, kas kopā ar parasto lunasīna monomēro molekulu tika izdalīts no žurku nierēm un aknām. Farmakoloģiskais efekts dimēram un sintētiskajam lunasīnam ir līdzīgs (20).



**1.4. Att. Vesternblota analīze komerciāli pieejamiem lunasīna avotiem. A-hidrolizētais sojas proteīns; B-izolētais sojas proteīns; C-sojas pārslas; D-sojas proteīna koncentrāts; L-tīrs lunasīns (2.5µg) (19).**

Citi pētnieki arī pamanīja interesantu sakarību starp no audiem izolēto lunasīnu un molekulas svaru. Tā no žurku, kas bija barotas ar lunasīnu bagāto soju, asinīm atgūtais lunasīns bija monomēra veidā, bet atgūtais no aknām dimēra veidā. Tomēr abi lunasīna veidi uzrādīja vienādu bioaktivitāti un darbojās līdzīgi kā sintētiskais lunasīns (21).

## 1.2. *Glycine max* un tājā saturošas funkcionālās vielas

Soja (*Glycine max*) ir viengadīgs tauriņziežu dzimtas pākšaugš. Pārtikā izmanto sojas pupiņas, kas ir svarīgs augu olbaltumvielu avots. Sojas dabiskais izplatības areāls ir Ķīnas centrālā daļa. Ir zināms, ka soja jau vairāk nekā 5000 gadus Ķīnā tiek lietota uzturā. Mūsdienās lielākā daļa sojas tiek izaudzēta Amerikas Savienotajās Valstīs, Brazīlijā un Argentīnā.

Sojas pupās pirms lunasīna tika atklātas citas funkcionālās vielas ar preventīvo pretvēža darbību, to skaitā intensīvi pētīts tika Bovmana birka proteāzes inhibitors jeb BBI. Tas ir 71 aminoskābju garš peptīds, kam piemīt spēja inhibēt serīna proteāzes – tripsīnu un himotripsīnu. Tripsīna inhibīcijas saits asociējas ar negatīvu ietekmi uz diētas proteīnu biopieejamību, bet himotripsīna inhibīcijas saits ar vēža preventīvo efektu (22, 23). BBI ir iesaistīts iekaisuma procesos, samazina oksidatīvā stresa bojājumu, supresē kancerogēnēzi, ietekmējot protolītiskos procesus un kontrolējot proto-onkogēnu ekspresiju (9). Diemžēl lielas izmaksas BBI attīrīšanai neatstāj izvēli un ir jālieto BBIC, kas ir BBI proteīnu koncentrāts (*Bowman Birk inhibitor concentrate*) un bez BBI satur citu proteīnu piemaisījumus. Uzskata, ka BBIC piemīt preventīvā darbība pret dažādiem vēžu veidiem, kurus eksperimentos inducē ar ķīmiskiem kancerogēniem un radiāciju (24). Un pētījumos par visa BBIC aktivitāti pieņēma BBI efektus, neņemot vērā pārējos proteīnus un peptīdus BBIC sastāvā (21). Bet veicot detalizētāko BBIC izpēti, atklājās, ka koncentrāts satur 360 ng/μg lunasīna un 74.4 ng/μg BBI uz 1 μg proteīna. Lunasīns sastāda aptuveni 44% no totālās BBIC proteīna masas. Tas nozīmē, ka minētajos BBIC efektos ir iesaistīts lunasīns un varbūt arī citi peptīdi (21). Pašlaik BBI tiek pārbaudīts klīniskajos pētījumos uz cilvēkiem un ir parādījis labu pretvēža darbību in vitro un in vivo (1).

Viens cits peptīds ir bieži minēts, runājot par sojas pretvēža īpašībām, un tas ir KTI jeb *Kunitz trypsin inhibitor* vēl viens proteāzes inhibitors, kuru izdalīja no sojas pupām. Šī peptīda galvenā loma kancerogēnēzē ir pirmkārt vēža šūnu invāzijas un metastāžu supresija (25). KTI uzrāda arī vēža MCF-7 un HepG2 hepatomas šūnu augšanas inhibīciju (26).

Genisteīns, daidzeīns un gliceteīns ir trīs galvenie sojas izoflavoni, kuru struktūra ir līdzīga estrogēniem (27). To paplašinātā izpēte parādīja ginesteīna spēju inhibēt kancerogēnēzi ar vairākiem darbības mehānismiem (28). Neskaitot tā estrogēnos efektus, tam vēl piemīt anti-kancerogēns efekts estrogēnu neatkarīgā ceļā. Tāpēc ginesteīns ir kļūvīst par

perspektīvu vielu ER-negatīvā vēža ārstēšanā. Genisteīnam piemīt arī brīvo radikāļu piesaistīšanas efekts (9).

Sojas pupās atrasti arī glikoproteīni lektīni, kam piemīt vēža preventīvās īpašības un arī citotoksisks efekts uz cilvēka krūts vēža, aizkuņģa vēža un kuņģa vēža šūnu līnijām (29, 30). Vēl daži no plaši pētītiem pretvēža vielu kandidātiem sojā ir inositola heksofosfāts (*phytic acid*) un B-sitosterols. Un vēl sojas funkcionālo sastāvdaļu skaitā ietilpst imunomodulatori peptīdi, kas nomāc superoksīda anjonus, aktivē nespecifiskās imunitātes aizsargfunkcijas. Citiem peptīdiem piemīt angiotenzīna konvertējošā enzīma inhibīcijas aktivitāte un antioksidatīva, pretaptaukošanas aktivitāte (19).

Divas trešdaļas no publicētajiem epidemioloģisko pētījumu rakstiem par vēža profilaksi saista to ar sojas patēriņu (31). ASV *Food and Drug Administration* rekomendē cilvēkiem, kas grib samazināt holesterīna līmeni un kardiovaskulāro slimību risku lietot 25 g sojas proteīna dienā, kas ir ekvivalenti aptuveni 250 mg (32). Vai šī deva ir pietiekoša vēža preventīvos nolūkos vēl nav zināms. Pašlaik no sojas sēklām izdalītie bioaktīvie peptīdi: lunasīns un BBI tiek intensīvi pētīti kā pretvēža aizsardzības vielas (19).

### **1.3. Lunasīns augos un komerciāli pieejamos produktos**

Lunasīns ir atrasts visās sojas pupu šķirnēs (1). Un vēl miežos, kviešos, rudzos, amarantā (*amaranth*) un nakteņu dzimtas augos (9, 20). Un arī dažos augļos un citu sugu augos (*sunberry*, *wonderberry*, *jimson weed* un *bladder-chery*) koncentrācijā no 0.013 līdz 8.1 mg/g proteīna (9). Mūsu universitātē veiktajos pētījumos lunasīns tika atrasts arī tritikālē, kas cilvēka radīts graudaugs, sakrustojot rudzus un kviešus (4).

Lunasīna koncentrācija variē dažādos augos un to genotipos. Galvenokārt tā ir atkarīga no auga šķirnes un audzēšanas apstākļiem, tādiem kā temperatūra un augsnes mitrums. Pārbaudot audzēšanas faktoru un šķirnes likumsakarības lunasīna biosintēzei sojas augos, Wang un līdzautori parādīja, ka augsnes mitrums vismazāk ietekmēja lunasīna koncentrāciju, salīdzinot ar temperatūras iedarbību uz visām šķirnēm. Lielākās sakarības bija starp sojas genotipu un temperatūru un mitrumu. Tas nozīmē, ka katrai šķirnei maksimāla lunasīna

koncentrācija tiek sasniegta pie raksturīgas temperatūras un augsnes mitruma (18). Sēklu dīgšanas laikam arī ir ietekme uz izaugušā auga lunasīna saturu (33).

*1.1. Tabula. Lunasīna daudzuma salīdzinājums dažādās sojas šķirņu klasēs (19).*

Sojas šķirņu klase	šķirņu skaits	vid. lunasīna saturs mg/g ekstrahētā proteīnā	vid. lunasīna saturs mg/g miltos	lunasīna konc. robežas šķirnēs mg/g
Ekzotiskā	95	5,9 ± 3,3	5,3 ± 2,9	1,0 – 13,3
Vecā	33	7,2 ± 1,9	6,5 ± 1,6	3,6 – 10,1
Modernā	16	6,4 ± 1,9	6,0 ± 1,7	3,3 – 9,5

Starp 144 visizplatītākajām sojas šķirnēm lunasīna koncentrācija variēja no 0.1 līdz 1.3 g/100 miltu (19). Sojas pupu sēklās bez BBI arī atrasts lunasīns koncentrācijā no 3.3 līdz 16.7 ng/mg sēklu, kas liecina par to, ka augs producē lunasīnu bez BBI starpniecības (34). Tika veikti pētījumi sojas pupu sugai *Teakwongkong* lai uzzinātu, kad lunasīns parādās augā. Rezultāti parāda, ka lunasīns var noteikt augā pēc 6 nedēļām (0.01 µg/g sēklu). Bet maksimālā koncentrācija parādās izaugušam augam - 0.12 µg/g sēklu (35). Sēklu sagatavošana pirms iestādīšanas arī ir svarīga, piemēram, sēklu diedzēšana ūdenī samazina lunasīna koncentrāciju jau pēc 2 dienām, bet pēc 7 dienām tas vairāk nav sēklās izmērāms, gan gaismas, gan tumsas apstākļos diedzētām sēklām (35).

2004 gadā tika publicēts pētījums par lunasīna saturu komerciāli pieejamos sojas produktos. Sojas proteīnā lunasīna koncentrācija bija 13–44 mg/g miltu, ar lunasīnu bagātos sojas miltos koncentrācijas sasniedza 27.3 mg/g miltu (19).

*1.2. tabula. Lunasīna saturs dažādos sojas produktos (19)*

sample	mg lunasin/ g extracted protein		mg lunasin/ g flour	
	mean	SD	mean	SD
soy flour (48% protein)	20	4	14	3
soy flakes (50% protein)	16	3	13	2
soy flour (50% protein)	21	2	12	2
soy powder	34	3	14	2
soy protein concentrate (60–76% protein)	70	9	28	3
isolated soy protein (84.6–88.2% protein)	81	8	38	4
hydrolyzed soy protein (82% protein)	77	6	44	6

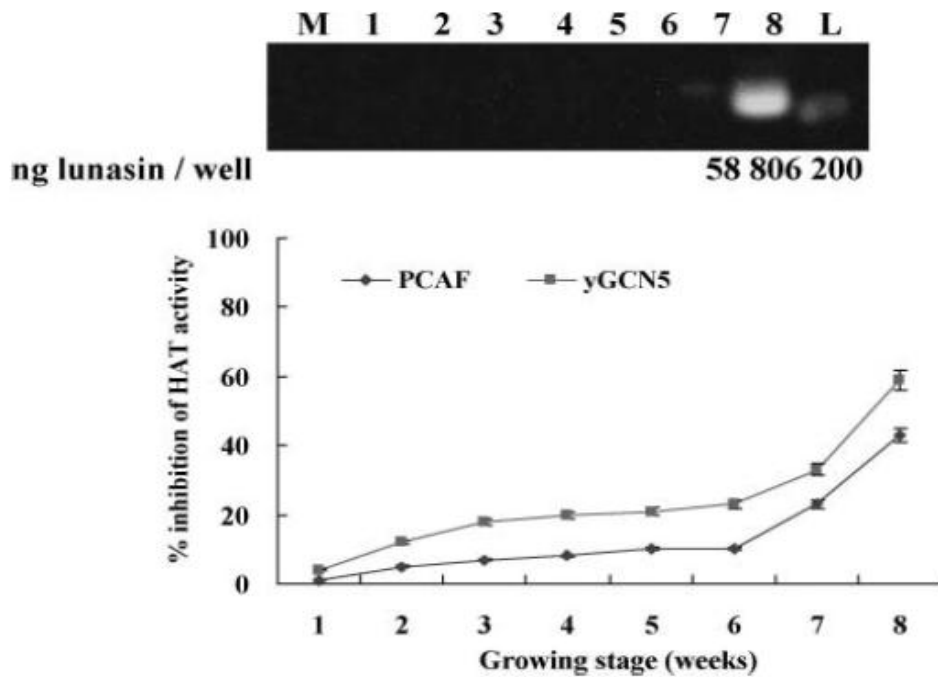
2009. gadā tika publicēti dati par lunasīna saturu komerciāli pieejamā sojas pārtikā piens, zīdaiņu formulas, tofu, pupu krējumā, sojas pupu kūka un citos produktos. Pielikumā 1. Ir parādīti dati par produktiem un lunasīna, BBI saturu tajos. Šo abu peptīdu koncentrācijas visticamāk atšķirās produktos, lietojot dažādu augu šķirņu un pagatavošanas procesa tehnoloģiju (36). Vidēji sojas pupas satur 40% proteīnu, 50-70% no tiem ir b-konglicinīns un glicinīns (37, 38).

1.3. tabula. Lunasīna satura dažādās miežu šķirnās (20).

Cultivars	Protein <sup>a</sup> (μg/ml)	Lunasin <sup>a</sup> (ng/μg protein)	Lunasin <sup>a</sup> (μg/g seed)
<i>Hordeum vulgare</i> L.			
<i>cv. Kunkang</i>	1.89 ± 0.19	6.2 ± 0.9	46.9 ± 2.2
<i>cv. Dahyang</i>	2.56 ± 2.20	6.2 ± 0.7	63.8 ± 3.6
<i>cv. Dasong</i>	2.50 ± 2.00	3.1 ± 0.6	30.7 ± 1.9
<i>cv. Nonghwa</i>	2.83 ± 2.60	1.1 ± 0.2	12.7 ± 0.9
<i>cv. Salrok</i>	2.87 ± 2.90	8.6 ± 1.1	99.0 ± 4.3
<i>cv. Olbori</i>	2.49 ± 2.00	5.3 ± 0.8	52.5 ± 3.9
<i>cv. Teapyung</i>	2.25 ± 2.10	7.6 ± 1.0	68.2 ± 4.2
<i>cv. Taegang</i>	1.93 ± 1.90	2.4 ± 0.5	18.4 ± 1.1
<i>cv. Heanchal</i>	2.25 ± 2.30	3.2 ± 0.6	23.9 ± 0.8

<sup>a</sup>Values represent averages ± standard deviations from triplicate determinations.

Miežu sēklās lunasīna koncentrācija ir 99 μg/g sēklu, kas ir daudz lielāka nekā sojas sēklās (20). Līdzīgi kā sojā miežos lunasīns parādās septītajā sēklu dīdzesēšanas nedēļā. Bet testējot auga ekstraktus uz HAT (histonu acetiltransferāzes) enzīma inhibīciju, efekts sāk parādīties jau otrajā nedēļā, kad parādās lunasīns, un gandrīz nemainās līdz septītajai nedēļai (20).



1.5. att. A daļa: Vesternblota analīze. 1-8 audzēšanas nedēļas, M molekulārie marķieri, L sintētiskais lunasīns. B daļa: divu histonu inhibīcijas atkarība no iegūtā auga ekstrakta katrā nedēļā.

Ir noteikta lunasīna koncentrācija arī kviešos 3.95-17.2 mg/g proteīna (40), amarantā (*Amaranth*) 11.1 µg/g proteīna (41) un tritikālē 0.43 – 6.46 mg/g graudu (4). Bet pagaidām nav datu, kas parādītu lunasīna koncentrāciju no graudiem iegūtos pārtikas produktos. Bet kā var redzēt pielikumā 1. vislielākā līdzība lunasīna koncentrācijā no testētiem sojas produktiem ar kviešiem un miežiem ir novērojama sojas piena produktos (11).

Ir izvirzīta hipotēze par to kādam nolūkam kalpo lunasīns augos. Tiek piedāvāta tā loma sēklu attīstībā. Trīs angiospermas sēklu attīstības stadijas ir: ātra dalīšanās un diferenciācija, šūnu dalīšanās pārtraukšana centrālās parenhīmas šūnās dīgļlapu un angiospermu augiem, kam seko šūnu palielināšanās izmērā, pieaugot ogļhidrātu, proteīnu, lipīdu un nukleīnskābju biosintēzes intensitātei. Nobeigumā sēklas dehidratējas. Tā notiek sēklu attīstība un nobriešana. Otrā fāze tiek uzskatīta par īpatnēju angiospermas sēklām, kad notiek DNS endoreplikācija, tas nozīmē DNS replikācija bez sekojošās šūnu dalīšanās.

Endoreplikācija ir īpatnējs kodola process, kad šūnas ciklā notiek G1 un S fāzes bez sekojošās šūnas dalīšanās, tā DNS sintēze ir atdalīta no dalīšanās, ļaujot pavairot DNS intensīvākai vielu sintēzei un produktu uzglabāšanai. Lunasīna loma šajā procesā ir endoreplikācijas nodrošināšana, tādā veidā tas aktivē otro sēklu attīstības fāzi. Zinātnieki

izvirzīja teoriju, ka visās angiospermas sēklās ir jābūt lunasīnam. Miežos un kviešos tas ir pierādīts, bet parastās pupās nav atrasts, tomēr secināt, kāda īsti ir lunasīna loma augos, vēl ir par agru (1).

#### 1.4. Lunasīna iegūšana iespējas

Patlaban tiek meklēti jauni efektīvi un izmaksas ziņā izdevīgi lunasīna iegūšanas ceļi. To veicina sintētiskā lunasīna ļoti augstā cena un augošs pētījumu skaits (3). Pirmo reizi 2009. gadā izdevās izdalīt un attīrīt lunasīnu no beztauku sojas miltiem. Vēl zinātnieki publicēja pirmo veiksmīgo mēģinājumu rekombinantai lunasīna ekspresijai *E. coli* baktērijās, lietojot T7 ekspresijas sistēmu lunasīnam. Tika uzsynetizēts lunasīna gēns ar polimerāzes ķēdes reakciju, ievietojot tajā poli-histidīna (histidīna aminoskābju sekvence) iezīmi pie C- un N-termināla. Gēns tika ievietots pET29a plazmīdā, kuru ievietoja baktērijā. Pēc 4 stundām lunasīna koncentrācija Luria-Bertani barotnē sasniedza 4,73 mg/L un tas neietekmēja baktēriju augšanu vai lunasīna ekspresiju (42).

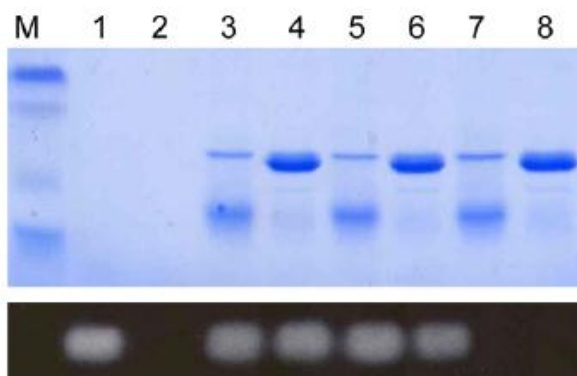
Pārbaudot rekombinētā lunasīna aktivitāti atklājās, ka tas darbojas analogiski sintētiskajam un uzrāda tādas pašas īpašības. Molekulas svārs bija kā prognozēts 11,35 kDa, kas ir lielāks par lunasīna monomēra svāru tāpēc, ka ir pievienotas histidīna aminoskābju iezīmes. Rekombinētais lunasīns ir 92-aminoskābju garš. Šis liekā aminoskābes pagaidām neparāda izmaiņas bioaktivitātē, salīdzinot ar dabisko 43 aminoskābju garo lunasīnu, un uzrāda tādas pašas īpašības. Salīdzinot ar citām piedāvātajām lunasīna ekstrakcijas vai sintēzes metodēm, šī metode ir ļoti laika un izmaksu ziņā izdevīga. Salīdzinot ar rekombinanto ekspresiju, lunasīna ekstrakcija no augu materiāla ir ļoti sarežģīts process (42).

Mēģināja ekspresēt *E. coli* baktērijās lunasīna un zaļi fluorescējošā proteīna kompleksu (Green fluorescent protein (GFP)-lunasīns), bet šī kombinētā molekula izsauca toksicitāti un baktēriju nāvi (43). Tomēr GFP-lunasīnu var producēt lielā daudzumā lietojot *in vitro* transkripciju/translāciju ar RTS-500 (The Rapid translation system) tehnoloģijas palīdzību (43). Tā ir ļoti produktīva metode, bet nepieciešamais aprīkojums un reaģenti ir pārāk dārgi.

## 1.5. Lunasīna biopieejamība

Svarīga īpašība vēža preventīvai vielai ir pēc per os uzņemšanas izvairīties no gastrointestinālās degradācijas, absorbēties un nokļūstot sistemātiskajā cirkulācijā tikt līdz audiem un orgāniem intaktā aktīvā formā. Salīdzinot ar lielāko daļu mazmolekulāro zāļu vielu, peptīdiem piemīt liela afinitāte, spēcīgs mērķmolekulu specifiskums un zema toksicitāte. Un vēl peptīdi viegli šķērso audu membrānas nelielā izmēra un specifisko fragmentu dēļ, tāpēc tie ir perspektīvi kā aģenti vēža terapijā (9). Lunasīnam piemīt visas šīs īpašības un ir pierādīts, ka tas šķērso arī smadzeņu-asinsvadu barjeru (21).

Pirmie biopieejamības pētījumi tika veikti ar pelēm, barojot tās ar lunasīnu bagātiem sojas proteīniem. Rezultāti parādīja, ka 35% lunasīna nokļuva mērķa orgānos un audos aktīvā formā (44). Interesantu faktu atklāja Park *et al* 2007 gadā, pierādot, ka BBI un KTI sojas pupās aizsargā lunasīnu no gastrointestinālās degradācijas, palielinot tā biopieejamību (45). Lai saprastu BBI un KTI ietekmi uz lunasīna šķelšanu, tika veikti pankreatīna lunasīna sagremošanas *in vitro* pētījumi. Rezultāti parādīja, ka BBI un KTI pasargā lunasīnu no degradācijas pat pēc to denaturācijas uzvārot. Neuzvārtie BBI un KTI pasargāja attiecīgi 93% un 97% lunasīna, bet uzvārtie par 98% un 84%. Salīdzinājumam, ja pankreatīns iedarbojas uz vienu pašu lunasīnu, tad pēc stundas lunasīnu neatrod, jo tad tas tiek viegli sagremots



Sample	M	1	2	3	4	5	6	7	8
Lunasin	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Pancreatin	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BBIC	-	-	-	+	-	+	-	+	-
KTI	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Boiling	-	-	-	-	-	+	+	-	-
37°C, 1h	-	-	+	+	+	+	+	-	-

(21).

**1.6. att. Lunasīna sagremošanas rezultāti *in vitro* testā. A daļa: westernblota analīze, M molekulārie svāra markieri, 1-8 lunasīna paraugi. B daļa: *in vitro* gremošanas plāns.**

Piedāvāta hipotēze, ka BBI kā apvalks pasargā lunasīnu, un apvalkotais lunasīns izejot intakts kuņģī un divpadsmitpirkstu zarnu, brīvi absorbējas tievajās zarnās (pielikums 2). Fakts, ka arī pats lunasīns ir termostabils nozīmē to, ka, pat izejot termoapstrādi, sojas pupu produkti saturēs lunasīnu ar pietiekošu biopieejamību (1, 21, 45).

Ar  $H^3$ -iezīmēts sintētiskais lunasīns pēc *per os* ievadīšanas pelēm tika atrasts dažādos audos, to skaitā plaušu, krūts dziedzeru, prostātas un smadzeņu audos (21). Citi pētījumi parāda, ka lunasīns ir atrasts arī aknu audos un asinīs pēc peļu barošanas ar lunasīnu bagātiem sojas miltiem (11). No šiem audiem izolētā lunasīna aktivitāte tika testēta ar *foci-formation* testu, atgūtais lunasīns parādīja tādu pašu rezultātu kā sintētiskais (21). Tas nozīmē, ka pēc nokļūšanas audos lunasīns paliek bioaktīvs. Ne tikai no sojas izdalītais lunasīns, bet arī no citiem augiem uzrāda stabilitāti pret pepsīna un pankreatīna ietekmi *in vitro* gremošanā. Aknās, nierēs un asinīs var noteikt lunasīnu pēc peļu barošanas ar lunasīnu bagātiem rudziem (20, 46).

2009. gadā tika veikti pirmie lunasīna biopieejamības pētījumi ar brīvprātīgiem vīriešiem. Pētījumi parādīja, ka vidēji tikai 4.5% (no 2.2% līdz 7.8%) no ar pārtiku uzņemtā lunasīna nokļūst sistemātiskajā cirkulācijā (39). Pēc 5 dienu barošanas perioda brīvprātīgiem tika paņemtas asinis 30 un 60 minūtes pēc pēdējās maltītes. Asins paraugi tika izanalizēti un salīdzināti ar kontroli. Vidēji lunasīna koncentrācija plazmā bija 71.0 ng/ml, kas ir ekvivalenti 0.213 mg lunasīna, ņemot vērā kopējo plazmas tilpumu 3 L (39).

sample	monoisotopic mass	sequence <sup>a</sup>	
baseline plasma <sup>b</sup>	833.49	INYIRR	
	890.51	GRINYIR	
	1046.61	GRINYIRR	
	530.35	QKKK	
	1806.95	KKMEKELINLATMCR	
	602.31	RNEGK	
	1426.57	FGPMIQCDLSSDD	
	3204.63	SPKCQCKALQKIMENSEELEEKQKKK	
	plasma 1 <sup>c</sup>	330.19	SPK
		890.50	GRINYIR
1046.61		GRINYIRR	
530.35		QKKK	
602.31		RNEGK	
1806.95		KKMEKELINLATMCR	
656.33		HIMEK	
3476.75		FTILLISLLFCIAHTCSASKWQHQQDSCRK	
2063.10		QKKKMEKELINATMCR	
446.21		NEGK	
plasma 2 <sup>d</sup>	472.27	IQGR	
	1186.50	WQHQQDSCR	
	860.45	MEKIQGR	
	890.51	GRINYIR	
	1046.61	GRINYIRR	
	530.35	QKKK	
	602.31	RNEGK	
	1806.95	KKMEKELINLATMCR	
	3476.75	FTILLISLLFCIAHTCSASKWQHQQDSCRK	
	1456.77	KQLQGVNLTPCEK	
480.18	CQCK		
1382.60	CCTEMSELKSPK		
2063.11	QKKKMEKELINLATMCR		

1.7. att.: Peptīdi brīvprātīgo cilvēku plazmā. a) Ar tumšākiem burtiem atzīmēti peptīdi, kas atbilst lunasīna struktūras fragmentiem, ar slīpo tekstu peptīdi, kas ir raksturīgi visiem plazmas paraugiem; b) plazmas paraugs pirms pētījuma, bez sojas uzņemšanas pārtikā vismaz 1 nedēļu; c) plazmas paraugs paņemts pēc 30 min pēc pēdējās maltītes; d) plazmas paraugs paņemts pēc 60 min pēc pēdējās maltītes (39).

## 1.6. Lunasīna farmakoloģiskie efekti

Eksperimenti ar zīdītāju šūnu līnijām parāda, ka lunasīns preventē šūnu transformāciju par malignānām no ķīmiskiem kancerogēniem. Un tas neietekmē normālo šūnu morfoloģiju un proliferāciju (11). In vitro eksperimentos lunasīns protektē C3H10T1/2 peļu mezenhimālo fibroblastu šūnas (16) un NIH3T3 peļu embrionu fibroblastu šūnas (47) no DMBA (7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene) un MCA (3-methylcholanthrene) ķīmisko kancerogēnu ietekmes. Lunasīna preventējošais efekts ir daudz izteiktāks par BBI ekvivalentos apstākļos un

koncentrācijā. Ir pierādīts lunasīna inhibīcijas efekts arī uz šūnām ar aktivētiem onkogēniem, šūnām ar deaktivētiem vēža supresor-gēniem. (16, 17, 48). Bieži cilvēku vēža šūnās ir aktivēti ras-onkogēni, kas aktivē MAPK signālu kaskādi, šis mehānisms spēlē centrālo lomu šūnu dalīšanās procesā, proliferācijā, izdzīvošanā un nāvē. *In vitro* eksperimentos ar šūnām, kam ir inducējams ras-onkogēns, lunasīns nepieļāva šūnu transformēšanos par malignāntām (48). Pat šūnās ar aktīvu E1A vīrusu onkogēnu, kā galvenā darbība izpaužas RB (*tumor supresor retinoblastoma protein*) supresija, lunasīns samazināja *foci formation* skaitli un palielināja p21 proteīna līmeni (17, 49). Pēdējie pētījumi liecina, ka lunasīns ne tikai novērš šūnu transformāciju un protektē no ķīmiskiem kancerogēniem, bet spēj citotoksiski iedarboties arī uz pilnībā transformētām vēža šūnām. No beztauku sojas miltiem izdalītais lunasīns uzrādīja citotoksicitāti resnās zarnas vēža šūnām ar sekojošām  $IC_{50}$ : 13,0  $\mu$ M KM12L4 šūnām (īpaši metastazējošās), 21,6  $\mu$ M RKO šūnām, 26,3  $\mu$ M HCT-116 šūnām un 61,7  $\mu$ M HT-29 šūnām (50). Cits pētījums pierāda lunasīna inhibējošo efektu uz estrogēn-neatkarīgo krūts vēža šūnu MDA-MB-231 augšanu ar  $IC_{50}$ = 181  $\mu$ M (51) un uz leukēmijas šūnām ar  $IC_{50}$ = 14  $\mu$ M (52).

Lunasīna no vēža pasargājošās īpašības ir pētītas arī *in vivo*. Pirmais modelis, kuru lietoja šiem eksperimentiem, bija ar ķīmisko kancerogēnu inducētais SENCAR peļu ādas vēzis (16). Zinātnieki parādīja, ka lunasīns topiskās aplikācijās devās 250  $\mu$ g/nedēļā supresēja ar DMBA un TPA (tetradecanoylphorbol-13-acetate) izraisīto ādas vēža izveidošanās biežumu, pagarināja latento periodu par 70% un samazināja audzēja lielumu (16). Ir arī pierādījumi, ka lunasīns spēj kavēt ar DMBA inducētās papilomas veidošanos peļu ādā, bremsējot epidermālo šūnu proliferāciju (53).

Krūts vēža pētījumos ar lunasīnu bagāta diēta uzrāda inhibitoro ietekmi uz vēža attīstību ar DMBA inducētā peļu modelī (54). Lunasīns samazina vēža gadījumu skaitu un attīstību un audzēja masu peļu XENOGRAFT modeļos. Bez spalvu pelēm (nude) pārstādīja cilvēku krūts vēža šūnas MDA-MB-231 un ievadīja lunasīnu *i.p.*. Ievadot lunasīnu 20 mg/kg devā, vēža gadījumu skaits samazinājās par 49% un no devas 4 mg/kg par 33%. Šajā pašā eksperimentā BBI neuzrādīja līdzīgas īpašības (21). Krūts vēža modeļos lunasīns uzrādīja šūnu proliferācijas inhibīciju un inducēja apoptozi.

#### 1.4. Tabula. Lunasīna ietekme uz ER-negatīvo krūts vēža šūnu līnijām

Šūnu līnija/dzīvnieku modelis	Pretvēža aktivitāte
MDA-MB-231 šūnas	↓ šūnu proliferācija, šūnu dalīšanās cikla arests S-fāzē, ↓ CDC25A ekspresija, kaspāze 8, Ets2, Myc, Erbb2, PIK3R1, JUN signālu gēni, ↓ ciklīnu D1, D3, un CDK4, CDK6 proteīnu ekspresija.
DMBA-inducētās transformētās NIH/3T3 šūnās	↓ <i>foci formation</i> un šūnu proliferācija
DMBA-inducētais krūts vēzis SENCAR pelēs	↓ vēža gadījumu skaits
Xenograft MDA-MB-231 šūnas bezspalvu pelēs	↓ vēža gadījumu skaitu, ↓ šūnu proliferācija un inducēta apoptoze

Barojot inducētās SENCAR peles ar DMBA kopā ar lunasīnu bagāto soju, pamanīja inhibējošo ietekmi uz krūts vēža attīstību. Divu gadu pētījums parādīja, ka šīm pelēm, uzņemot lunasīnu vienreiz nedēļā, samazinājās audzēja attīstība par 38% un audzēju gadījumu skaits par 25%, salīdzinot ar kontroles grupu. Tika novērota arī samazināta šī vēža mestastazējošā aktivitāte (54).

Lunasīnam piemīt arī pretiekaisuma aktivitāte un antioksidatīva darbības, kas ļoti labi pilnveido lunasīnu ka potenciālo pretvēža zāļu vielu. 2009 gadā pirmoreiz bija publicēts ka lunasīns samazina ar lipopolisaharīdu (LPS) inducēto citokīnu daudzumu, tādu kā IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE2, RAW 264.7 makrofāgu šūnās, caur kodola faktora kB (NF-kB) supresiju (55, 56). Dia un līdzautori ir noskaidrojuši šīs parādības norises mehānismus. Lunasīns modulē cilkooksigenāzi-2 (COX-2) un idecējamā slāpekļa oksīda sintāzi (iNOS) darbību (3). Vel eskperementos ar LPS ir novērots ka lunasīns samazina reaktīvā slāpekļa daudzumu, darbojoties ka antioksidants (55). Izdalītais no *Solánium nígrum* ir uzrādījis DNS aizsargājošo darbību pret hidrosilradikāļu oksidatīvās ietekmes, bloķējot fentona reakcijas norisi (57).

#### 1.7. Lunasīna kombinācija ar aspirīnu

Par visefektīvākajām stratēģijām pret vēža slimībām tiek uzskatītas kombinētās terapijas. Ar tādu piegājienu var palielināt pretvēža darbību un samazināt terapijas toksicitāti attiecībā pret normālām šūnām (58, 59). Aspirīns ir parādījis sevi kā viens no visefektīvākajiem vēža preventīviem līdzekļiem vairākos vēža gadījumos. Bet tā izraisītie

blakus efekti kā peptiskā čūla, asiņošana un t.t. ir ļoti izteikti, un tāpēc tas nevar būt pielietojams tādām indikācijām. Bet ir atklāts, ka kombinācijā ar lunasīnu aspirīns uzrāda sinerģisku efektu un varētu to lietot zemākās devās, respektīvi ar mazākām blaknēm (51). Kombinācijā ar aspirīnu lunasīns potencē tā darbību - proliferācijas inhibīciju un apoptozes indukciju cilvēku krūts vēža sūnās MDA-MB-231 (51). Spēcīgu efektu uzrādīja kombinācija aspirīns 0.5 mM koncentrācijā un lunasīns 10 $\mu$ M koncentrācijā, kas deva 73% šūnu skaita samazinājumu. Šis efekts vismaz daļēji bija izsaukts modulējot G1 un S fāzes regulatoros proteīnus un ekstracelulāro apoptozes atkarīgo ceļu. Un arī samazinot šo gēnu ekspresiju *ERBB2*, *AKT1*, *PIK3R1*, *FOS* un *JUN*, jo tie ir asociēti ar krūts vēža attīstību un nejutību pret apoptozes mehānismiem. Vēl pētījumi pierāda, ka lunasīna kombinācija ar aspirīnu uzrāda spēcīgāku efektu uz *foci formation* supresiju un šūnu proliferāciju šūnu līnijai NIH/3T3, kurai ar DMBA un MCA kancerogēniem inducēta vēža attīstība, nekā šīs vielas atsevišķi (51).

### **1.8. Lunasīna pretvēža darbības molekulārie mehānismi.**

Lunasīnu var nosaukt par sargsuni (*watchdog*) tāpēc, ka tas internalizējas šūnu kodolos un gaida savu kārtu. Ar to ir domāts tas, ka normālās šūnās tas nedara neko, bet tiklīdz rodas pārmaiņas, transformācija vēža šūnā, lunasīns iesaistās procesā (1). Un pats galvenais fakts ir tas, ka lunasīns darbojas arī uz pilnīgi transformētām vēža šūnām (60).

Galvenais darbības mehānisms ir histonu acetilācijas inhibīcija, tas ir epigenētiskais regulācijas ceļš, kas ir ļoti būtisks šūnu transformācijā par malignāntām un vēža attīstībā (61, 62). Normālā stāvoklī vairums H3 un H4 histonu atrodas deacetilētā stāvoklī, tas ir ar uzfīto DNS. Pievienojot histoniem nātrija butirātu, kas ir histonu deacetilācijas inhibitors, histoni paliek acetilēti, bet pieliekot klāt lunasīnu acetilēto histonu skaits samazinās. To novēro C3H10T1/2 fibroblastu šūnās un MCF-7 krūts vēža šūnās (16, 48). Lunasīns uzrāda arī konkurenci ar HAT enzīmiem  $\gamma$ GCN5, PCAF, inhibējot acetilāciju un supresējot šūnas cikla progresiju (44, 63, 64). Balstoties uz šiem faktiem tika piedāvāts epigenētiskais lunasīna darbības mehānisms, kurā lunasīns nogalina transformējošās šūnas vai nesens transformētās, kurās ar ķīmiskiem kancerogēniem vai virāliem onkogēniem ir inaktivēti vēža supresorie proteīni kā Rb, p53 un pp32. Kad lunasīns atrodas kodolā, tas darbojas kā surogāts vēža supresors, cieši saistoties pie deacetilētiem histoniem un sagraujot balansu starp histonu acetilāciju un deacetilāciju. Šūna atpazīst šo darbību kā draudošu un pašlikvidējas (1).

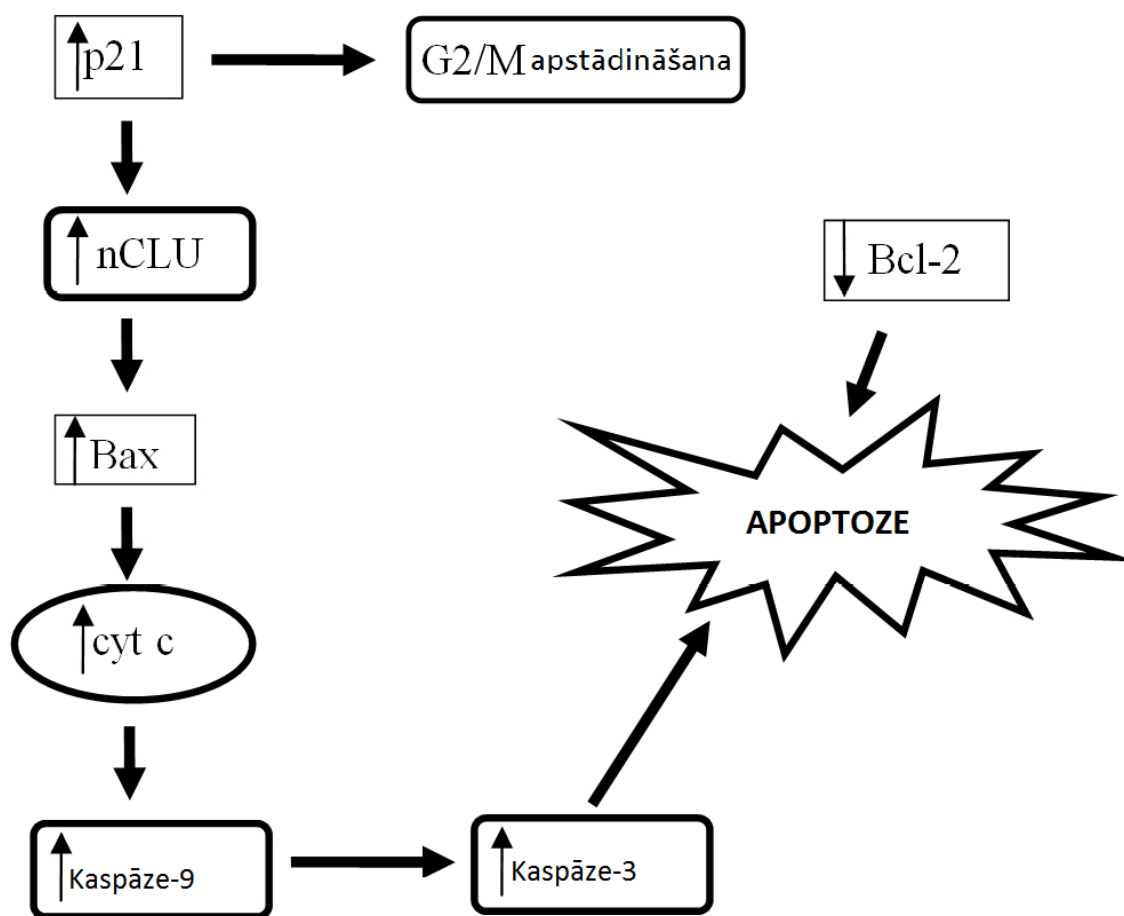
Lunasīns inhibē histonu acetilāciju ar ķīmiskiem kancerogēniem un/vai virāliem onkoģēniem, kas provocē vēža supresor gēnus RB, p53, Pp32, inducētās zīdītāju šūnās (1). Jauni dati parāda, ka H4 histonu acetilācijas inhibīcijai ir nepieciešama visa lunasīna molekula, bet par H3 histona acetilācijas inhibīciju lielākā daļā atbild tikai poli asparģīnskābes aste (11). Lizīna acetilācija specifiskās histonu vietās ir galvenokārt asociēta ar DNS izpakošanu no nukleosomām un gēnu transkripcionālās aktivitātes aktivāciju (65). Ir pierādīts, ka histonu acetilācija ir svarīga krūts vēža attīstībā (66). Pētījumos lunasīns 75μM koncentrācijā uzrādīja H4 histona Lys 8 un Lys 12 acetilācijas inhibīciju MDA-MB-231 krūts vēža šūnās atbilstoši par 17% un 19% (11).

2010. gadā pētnieki atklāja, ka lunasīna darbības mehānismi nebeidzas ar epiģenētisko regulāciju un ir daudz dziļāki. Tagad ir pierādīts, ka lunasīns modulē gēnu un proteīnu ekspresiju, kas ir iesaistīti šūnas cikla regulācijā, apoptozē un signālu transdukcijā (51). Uzskata, ka šūnas cikla inhibīcija ir efektīva stratēģija vēža attīstības apstādināšanai vai inhibīcijai. Šūnas ciklu regulē CDK – ciklīnu atkarīgās kināzes (*cyclin-dependent kinases*), kas aktivējas un inaktivējas pēc kārtas vadot šūnas ciklu. Galvenais regulējošais ceļš, kas pārved šūnu no G1 fāzes uz S fāzi ir CCN/CDK/p16/RB ceļš. Palielinātā D1 un D3 ciklīnu ekspresija ir visizplatītākās izmaiņas krūts vēžos. Šie ciklīni darbojas ar CDK4 vai CDK6 un formē katalītisko kompleksu, kas fosforilējot inaktivē RB un atbrīvo aktivēto E2F (67).

Lunasīns augšup regulē RB gēna ekspresiju (51), RB fosforilācijas inhibīciju (64), šie rezultāti pieļauj domu, ka lunasīns varētu būt atbildīgs par transkripcionālo un posttranskripcionālo RB modifikāciju.

Lunasīns par 45% šūnās apstādina dalīšanās ciklu S fāzē, inhibē proliferāciju, samazina CDk2, CDk4, CDC25A, kaspāzes 8, Ets 2, Myc, Erbb2, AKT1, PIK3R1, Jun gēnu mRNS daudzumu MDA-MB-231 šūnās (51, 68) un arī samazina D1 un D3 ciklīnu daudzumu CDK4 un CDK6 krūts vēža šūnās (69).

Resnās zarnas vēža HT-29 un KM12L4 šūnās lunasīns izraisīja G2/M fāzes šūnas cikla arestu un inducēja mitohondriālo apoptozes ceļu. Tas notika ar palielinātu p21 ekspresiju HT-29 šūnās un p21 un p27 proteīnu ekspresiju KM12L4 šūnās. Izrādījās, ka lunasīns pat palielināja apoptozi veicinošo Bax un samazināja apoptozi kavējošo Bcl-2 proteīnu līmeni. Tas varētu būt p21 palielinātās ekspresijas rezultāts, jo p21 inducē kodola klusterīnu (nuclear clusterin) (71).



1.8. att. Piedāvātais lunasīna darbības mehānisms cilvēku resnās zārnas vēža šūnās.

Minētā RGD motīva ietekme uz vēža metastazēšanos ir pierādīta KM12L4 šūnās. Lunasīns ietekmē ekstracelulārās matricas integrīnu ekspresiju. Integrīni ir proteīnu receptoru ģimene, kas regulē adhēziju un metastazēšanos. Lunasīns modificē 62 integrīnu gēnu ekspresiju, 48iem palielinot ekspresiju, 14 gēniem samazinot. Pie samazinātiem var minēt kolagēna VII a1, integrīna b2, matricas metaloproteināzes 10, selektīna E, integrīna a5 gēnus. Un palielinā gēnu ekspresija kolagēnam XIV a1. Šie rezultāti skaidro lunasīna pret vēža matastazēšanās efektus (71).

Lunasīna citotoksiskā darbība uz leukēmijas L1210 šūnām  $IC_{50}=14\mu M$  koncentrācijā tiek aprakstīta kā šūnas cikla apstādināšana G2/M fāzē. Tika novērota kaspāžu 3, 8 un 9 aktivitātes palielināšanās (11).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

- Sintētisks lunasīns – Caslo
- Ar fosfātu buferēts NaCl šķīdums (Phosphate buffered saline (PBS)) – Sigma
- Sārmainās fosfatāzes substrāta šķīdums (Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) liquid substrate system for ELISA) – Sigma
- Lunasīna poliklonālās antivielas - Millipore
- Anit-Rabbit IgG (whole molecule)-Alkaline phosphatase – Sigma
- 96 lauciņu plate nunc – MaxiSorp
- Dzemes kakla vēža šūnu līnija HeLa (ATCC nr. CCL-2)
- Neuroblastomas šūnu līnija SH-SY5Y (ATCC nr. CRL-2266)
- Olnīcu teratokarcinomas šūnu līnija PA1 (ATCC nr. CRL-1572)
- Cilvēka embrija nieru šūnu līnija HEK-293 (ATCC nr. CRL-1573)
- Šūnu kultivēšanas barotne *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, kat. nr. 32430) - *Gibco Life Technologies*
- F-12 maisījums (kat. nr. 31765) - *Gibco Life Technologies*
- 0,25% tripsīns-EDTA (kat. nr. 25200) - *Gibco Life Technologies*
- Nātrija piruvāts MEM (kat. nr. 11360) - *Gibco Life Technologies*
- MEM neaizstājamās aminoskābes (kat. nr. 11140) - *Gibco Life Technologies*
- *Dulbecco's* fosfāta buferšķīdums (DPBS, kat. nr. 14200) - *Gibco Life Technologies*
- Gentamicīns (kat. nr. 15710) - *Gibco Life Technologies*
- Embrionālais liellopu serums (FBS, kat. nr. 10106) - *Gibco Life Technologies*
- Dimetilsulfoksīds (DMSO, kat. nr. 41639) - Sigma

- Tiazola zilais tetrazola bromīds (MTT, kat. nr. M2128) - Sigma
- Penicilīns-streptomicīns (P4333) – Sigma
- Šūnu kultivēšanas 96-lauciņu plates ar speciālu pārklājumu *Cell+* (*Sarstedt*)
- Seroloģiskās pipetes (*Falcon*)
- Stobriņi (*Sarstedt*)
- Sterilie pipešu uzgaļi (*Gilson*),
- Automātiskais atsūcējs (*Pipetboy comfort*)
- Automātiskās mikropipetes (*Biohit*)

## 2.2. Aparatūra

- ELISA mikroplašu lasītājs ELX 808 IU - Biotek Instruments
- Ultraskaņas homogenizators IKA T10 basic Ultra TURRAX
- Centrifūga MIKRO 120 Hettich Zentrifugen.
- Inkubators Memmert
- Mikroskops Leica
- Hemocitometrs Neubauer
- Laminārs Kojair
- Centrifūga Biosan

## 2.3. Lunasīna kvantitatīvās noteikšanas ELISA metodes izstrādāšana

Standartlīkni iegūvām ar sintētisko lunasīna kristālisko peptīdu, atšķaidot ar destilēto ūdeni koncentrācijās: 0 (*blank*) 0,1; 1; 10; 20; 30; 50; 70; 90; 100; 110 un 120 ng/ml. 96-lauciņu platē MaxiSorb (Nunc) iepildījām katrā lauciņā pa 100 µL ar 4 paralēliem katru

lunasīna koncentrācijas šķīdumu. Lai lunasīns piesaistītos pie plates plastmasas, inkubējām 24 stundas 4°C. Pēc inkubācijas nepiesaistījušos lunasīnu no plates 3 reizes ar 200 µL 0.01M PBS + 0.05% Tween 20 (pH=7.4). Nekavējoties pēc mazgāšanas plati bloķējām 2 stundas ar 200µL 0.05M PBS + 2% kazas serumu + 1% Tween 20 šķīdumu. Tad atkal mazgājām plati 3 reizes ar mazgāšanas buferi. Pēc mazgāšanas pievienojām 50 µL lunasīna poliklonālās truša antivielas atšķaidījumā 1:4000 un inkubējām 1 stundu istabas t°. Pēc inkubācijas plati atkal mazgājām 3 reizes un pievienojām 50 µL antitruša IgG antivielu konjugātu ar sārmaino fosfatāzi atšķaidījumā 1:7000 un inkubējām 1 stundu istabas t°, antivielu atšķaidīšanai lietojām 0.05M PBS + 3% BSA + 1% Tween 20 šķīdumu. Pēc inkubācijas plati atkal mazgājām 3 reizes un pievienojām 100 µL hromogēna p-nitrofenilfosfāta un atstājām uz 20 min tumšā vietā istabas t° (ieliek ELISA plate reader). Pēc 20 min nolasījām optisko blīvumu (OD) pie viļņa garuma 405 nm, ar ELISA plate reader ELX 808 IU no Biotek Instruments. 25. minutē hromogēna reakciju ar sārmanino fosfatāzi apstādinājām, pievienojot 100 µL 3M NaOH šķīduma. Pēc 10 min paturēšanas tumšā vietā ( 35. minūtē) nolasījām OD vēlreiz.

#### **2.4. Lunasīna koncentrācijas mērīšana peļu audu homogenātos**

Pēc dekapitācijas izolējām peles iekšējos orgānus un nosvērām. Peļu audu paraugus ievietojām 2ml mēģenēs (ependorph tipa), skalojām ar 1ml 0.05M PBS, lai atbrīvotos no asinīm. Tad visiem paraugiem pievienojām 0,5 ml 0,05M PBS un homogenizējām ar ultraskaņu 3-5 min (IKA T10 basic Ultra TURRAX). Pēc homogenizēšanas paraugus centrifugējām 10 min ar 3700 apgriezieniem min. Paņēmām 200 µL supernatanta un pārnesām citā mēģenē (ependorfa) un pievienojām 200 µL lunasīna šķīduma 0.05 PBS koncentrācijā 40 ng/ml un ar pipeti iemērījām 100 µL katrā MaxiSorb (Nunc) 96-lauciņu plates lauciņā, ņemot 3 paralēlos. Atstājām plati uz 24 h, lai audos esošais lunasīns piesaistītos plates plastmasai. Tālāk ar ELISA metodi mērījām lunasīna daudzumu, kuru aprēķinājām pēc standartlīknes.

#### **2.5. Cilvēka šūnu līniju audzēšana, tripsinizēšana, skaitīšana**

Pētījumā tika izmantotas dzemdes kakla vēža šūnu līnija HeLa (ATCC nr. CCL-2), neuroblastomas šūnu līnija SH-SY5Y (ATCC nr. CRL-2266), cilvēka embrija nieru šūnu līnija

HEK-293 (ATCC nr.CRL-1573) un olnīcu teratokarcinomas šūnu līnija PA1 (ATCC nr. CRL-1572). Šūnas tika audzētas 75 cm<sup>2</sup> flakonos 37 °C temperatūrā, 5% CO<sub>2</sub> atmosfērā un 95% relatīvā mitrumā. HeLa un PA1 tika kultivētas DMEM barotnē ar F-12 attiecībā 3:1 un ar 10% FBS, un 1% penicilīna-streptomicīna piedevu. SH-SY5Y šūnas tika audzētas DMEM barotnē, kas tika papildināta ar 10% FBS, 1% nātrija piruvātu, 1% MEM neaizstājamām aminoskābēm un 0.5% gentamicīnu.

Sasniedzot 50-70% konfluenci flakonā, šūnas tika vienu reizi mazgātas ar 10 mL DPBS un tad 1-2 minūtes tripsinizētas ar 2 mL 0,25% tripsīna/EDTA šķīdumu. Pēc tam šūnām tika pievienota barotne ar 20% FBS (2 mL) un DPBS (6 mL). Tad šūnu suspensija tika savākta, pārnesta centrifugēšanas stobriņos un centrifugēta 5 minūtes ar ātrumu 1200 rpm. Pēc centrifugēšanas supernatants tika noliets un šūnu saskaitīšanai tika izmantotas nogulsņējušās šūnas.

Vispirms šūnas tika suspendētas 1 ml barotnes, un tad 20 µL suspensijas tika uzņests uz hemocitometra jeb šūnu skaitīšanas kameras. Izmantojot *Leica* mikroskopu, šūnas tika saskaitītas 25 lauciņos, kas atbilst 1 mm<sup>3</sup>. Iegūtais skaitlis tika reizināts ar 10 000, iegūstot šūnu skaitu 1 mL.

## 2.6. Lunasīna citotoksicitātes noteikšana ar MTT metodi

MTT tests SH-SY5Y (p16) šūnām: 96 lauciņu platē ar taisnu pamatu uzsēja 30000 šūnu/lauc. Inkubēja 48 stundas, ļaujot šūnām pieķerties. Tad šūnas tika apstrādātas ar pētāmām vielām un inkubētas uz 48 stundām, 37°C temperatūrā. Tad katram lauciņam tika pievienoti 50 µL barotnes, kas saturēja lunasīnu dažādās koncentrācijās 0.001 µM, 0.01 µM, 0.1 µM, 1.0 µM, 10 µM vai rotenona koncentrācijas 0.01 µM, 0.1 µM, 1.0 µM. Kontroles un reāģentu (blank) lauciņiem tika pievienota tīra barotne. Šķīdinātāja kontrolei lietoja 5% PBS šķīdumu. Pēc inkubācijas katrā lauciņā pievienoja 15 µL *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) substrātu koncentrācijā 5 mg/mL šķīdinātu PBS. Plati inkubēja 2 h 37°C temperatūrā. Tad nolej barotni ar vielām, nosusina plati. Izveidojušos formazāna kristālus izšķīdināja ar 100 µL DMSO (100%) un pēc 10 min tika mērīta gaismas absorbcija ar ELISA mikroplašu lasītāju ELX 808 IU no Biotek Instruments pie 490nm.

MTT tests HeLa (p20) HEK (p10) un PA1 (p21) šūnām: 96 lauciņu platē ar taisnu pamatu uzsēja 25000 šūnu/lauc. Inkubēja 24 stundas, ļaujot šūnām pieķerties. Tad šūnas tika

apstrādātas ar pētāmām vielām un atstātas uz 48 stundām 37°C temperatūrā. Lunasīna koncentrācijas 0.001 μM, 0.01 μM, 0.1 μM, 1.0 μM, 10 μM (HEK šūnām 10 μM koncentrāciju neņēma). Rotenona koncentrācijas 0.01 μM, 0.1 μM, 1.0 μM. Tālākā darba gaita neatšķīrās.

## **2.7. Datu matemātiskā analīze**

Lunasīna koncentrācija peļu audu homogenātos aprēķināta pēc standartlīknes.

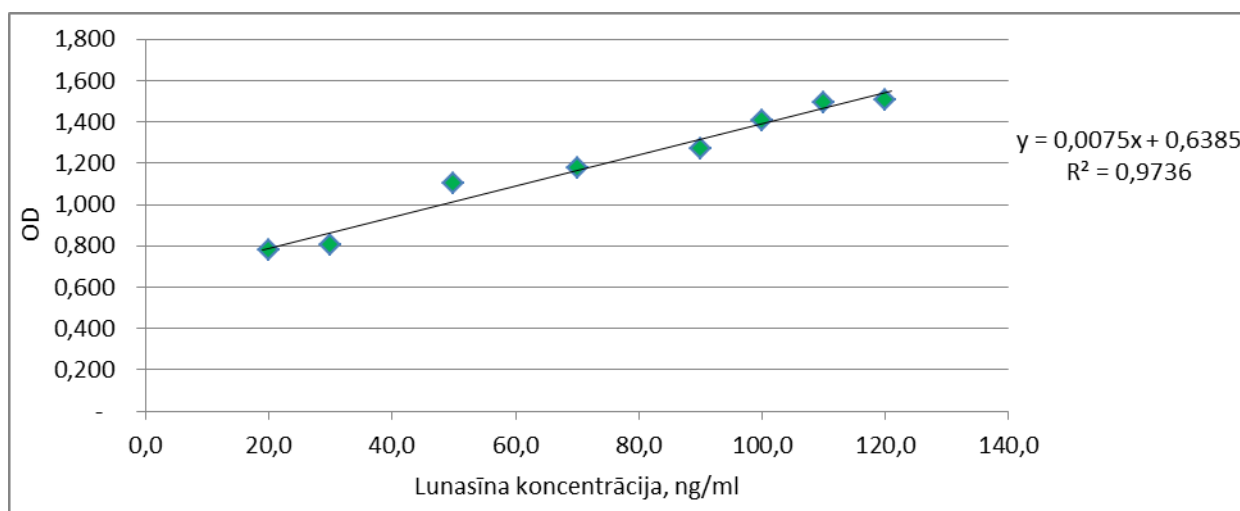
Šūnu dzīvotspējas analīzē rezultāti aprēķināti kā vidējie ± standartnovirze (S.D.). Statistiskā ticamība šūnu skaita izmaiņām noteikta ar ANOVA testu un dati analizēti GraphPad Prism v 5.00 programmā, pieņemot par statistisko ticamību p vērtību  $\leq 0,05$ .

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. Lunasīna kvantitatīvās noteikšanas ELISA metodes modifikācija

ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) metode lunasīna kvantitatīvai noteikšanai balstās uz 2004. gadā Elvira Gonzalez de Mejia publicēto metodi (19), bet ar mūsu modifikācijām. Vispirms meklējām atbilstošas antivielu atšķaidīšanas proporcijas. Izvēlējāmies atšķaidījumus, kas deva labu optiskā blīvuma un lunasīna koncentrācijas sakarību. Literatūrā minētas divu veidu lunasīna antivielas – poliklonālās trusī un peļu monoklonālās antivielas. Pēc literatūras datiem (19) autori izmantoja mums līdzīgus antivielu atšķaidījumus un aprakstīja samērā šauru peptīda koncentrācijas noteikšanas diapazona linearitāti.

Mēs vispirms ar sintētisko lunasīnu ieguvām standartlīkni (att. 3.1), kuru vēlāk izmantojām lunasīna satura noteikšanai nezināmas lunasīna koncentrācijas paraugā.



3.1. att. Lunasīna standartlīkne, koncentrācijas atkarība no OD.

Ar šo metodi iegūtā standartlīkne ļauj precīzi noteikt lunasīna koncentrāciju intervālā no 20 līdz 120 ng/ml. Mēģinājumos arī pierādījās, ka, mainot antivielu atšķaidījumu, var izmainīt metodes jutību (dati nav attēloti). Tā piemēram Elvira Gonzalez de Mejia ar kolēģiem ELISA metodē primārajām antivielām lietoja atšķaidījumu 1:1000 un sekundārajām 1:2000 (15). Ar tādiem atšķaidījumiem autori noteica lunasīnu koncentrācijā no 8 līdz 48 ng/ml (15). Mēs modificējām metodi liellopu seruma albumīna (*BSA bovine serum albumin*) vietā (kuru lietoja de Mejia plates bloķēšanai) izmantojot kazas serumu, jo mūsu pirmajos eksperimentos BSA nenobloķēja nespecifiskās saistīšanās vietas un rezultāti uzrādīja augstu fonu. Iespējams arī, ka poliklonālās antivielas pret lunasīna antigēna 19 aminoskābju garo peptīdu reaģēja ar

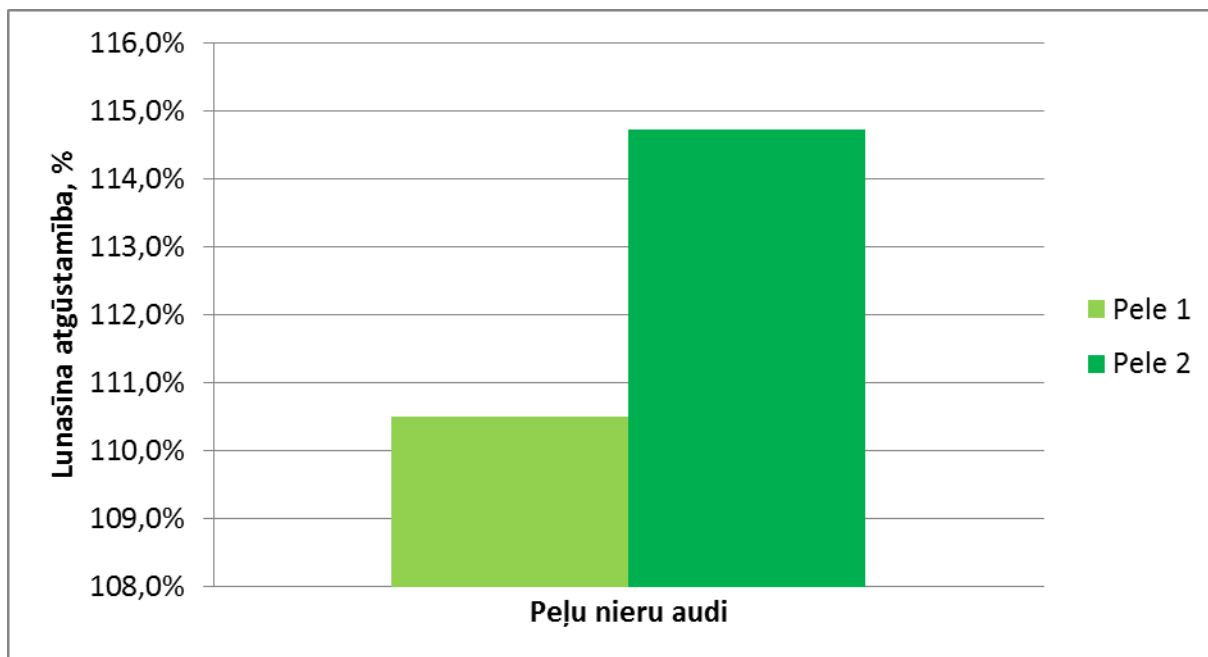
BSA un ietekmēja rezultātus (dati nav attēloti). Un atšķirībā no de Meija lietotajām monoklonālajām antivielām mēs lietojām poliklonālās un tās, ņemot par nespecifisko saistīšanās vietu bloķētāju kazas serumu, uzrādīja labu lunasīna noteikšanas iespēju lielākā koncentrāciju diapazonā.

ELISA metodes būtība ir antivielu kompleksa veidošana ar nosakāmo vielu. Izmantojamās plātēs ir speciāla virsma, kurai nespecifiski pieķerās nosakāmās molekulas, šim nolūkam vajadzīgs ilgs inkubācijas laiks. Mazgāšana ar PBS ir veikta, lai atbrīvotos no vielas pārpalikuma, kas nav pieķēries platei vai nav izveidojies komplekss plates plastmasas. Primārās antivielas ir specifiski mērķētas uz vielu, šajā gadījumā uz lunasīna (19 aminoskābes) fragmentu. Lai antivielas nepiesaistītos pie pašas plates, pirms antivielu pievienošanas plati nobloķē ar kazas serumu, kas aizņem visas nespecifiskās saistīšanās vietas, un neveido kompleksus ar antivielām. Bet sekundāro antivielu komnjugāts ar sārmaino fosfatāzi saistās ar primārām antivielām. Kad ir izveidojušies kompleksi (pētāmā viela-primārā anti-viela-sekundārā anti-viela-enzīms) un viss liekais ir nomazgāts, pievieno hromogēnu. Hromogēns ir noteiktas vielas šķīdums, kas pats par sevi ir bezkrāsains, bet reaģējot ar antivielu dod noteiktu nokrāsu šķīdumam. Katram hromogēnam ir noteikts viļņu garuma absorbcijas maksimums. Pie šī viļņa garuma arī nolasa plati, nosakot OD – optisko blīvumu. Pēc sakarības, jo lielāks kompleksu skaits, jo intensīvāka nokrāsa, var noteikt pētāmās vielas koncentrāciju.

### **3.2. Lunasīna biostabilitāte peļu audu homogenātos**

Veicot atgūstamības testu peļu audu homogenātos pēc zināmas lunasīna koncentrācijas pievienošanas novērojām, ka, pieliekot audiem lunasīnu 40 ng/ml koncentrācijā tas nav atgūstams liesas, aknu, sirds, hipotalāma, smadzeņu garozas, vidussmadzeņu, iegareno smadzeņu un smadzenīšu audos. Šie audi parāda OD no 0,11 līdz 0,097, kas liecina par to, ka lunasīns šajos audos varbūt ir, bet ir zem iespējamā kvantitatīvā noteikšanas līmeņa. Tas nozīmē, ka lielākā daļa lunasīna molekulu ir metabolizējušās audu proteāžu darbības rezultātā, jo šajā eksperimentā mēs nepievienojām homogenātiem proteāžu inhibitorus, ko parasti pievieno ekstrahējot lunasīnu no graudiem. Ja audos lunasīna vairs nav, tad neredzam tā saistīšanos ar primārajām antivielām. Bet negaidīti nierēs lunasīns uzrādīja pat 110,5% un 114,7% atgūstamību, kas liecina, ka lunasīns paraugā atrodas lielākā koncentrācijā nekā bija pielikts atgūstamības testā. Mēs pievienojām 40 ng/ml lunasīna. Šie rezultāti varētu liecināt,

ka lunasīns ir akumulējies nieru audos jau agrāk, iespējams no uzņemtās pārtikas un otrs pieņēmums ir, ka nierēs lunasīns metabolizējās lēnāk.

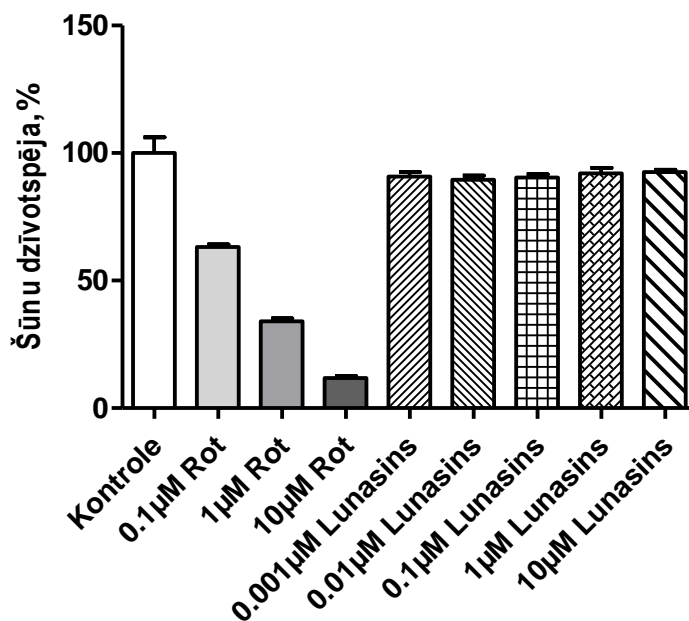


3.2. att. Lunasīna atgūstamības testa rezultāti divu peļu nieru audu paraugos.

Šis piloteksperiments ar tik nelielu dzīvnieku skaitu vēl neļauj izvirzīt pārliecinošus secinājumus un arī lunasīna saturs abām pelēm nierēs ir atšķirīgs, bet iegūtie dati atbilst agrāk publicētajiem, ka lunasīns pēc ar lunasīnu bagātu pārtikas produktu apēšanas ir atrasts nierēs (20, 46).

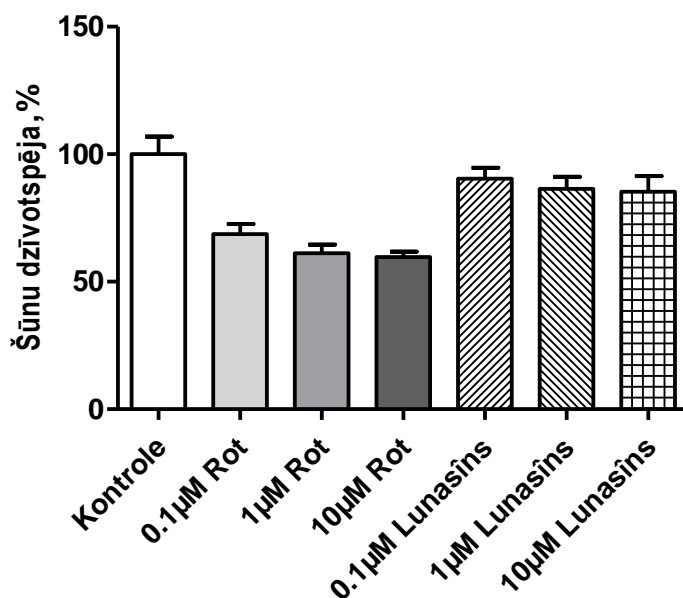
### 3.3. Lunasīna citotoksiskie efekti cilvēka šūnu līnijās

Ar MTT testu pārbaudījām lunasīna izraisīto efektu uz 4 šūnu līniju dzīvotspēju. Starp šūnu līnijām 3 vēža un viena normālā.



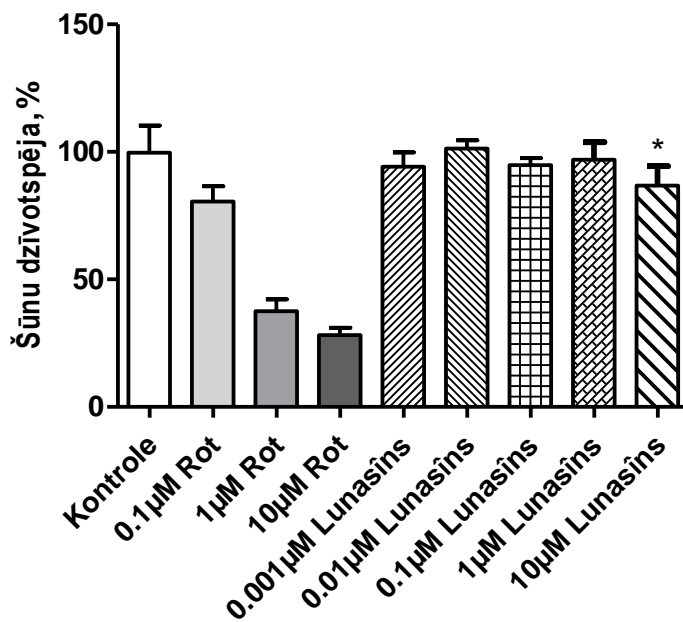
3.2. att. Lunasīna efekti uz dzīvo HeLa (p20) šūnu skaitu, inkubējot 48 stundas.

HeLa (endometrija vēža) šūnās lunasīns uzrādīja nelielu citotoksicitāti, bet nav redzama sakarība starp lunasīna koncentrāciju un izraisīto efektu. Toties rotenons, izteikts citotoksisks līdzeklis, rāda koncentrācijas atkarīgu citotoksisku ietekmi uz šūnām.



3.3. att. Lunasīna efekti uz dzīvo HEK p10 šūnu skaitu, inkubējot 48 stundas.

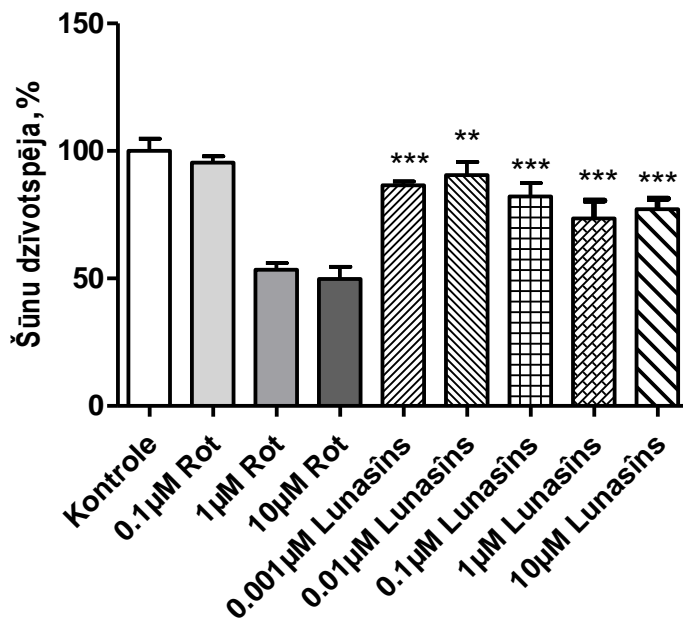
HEK (p10) (cilvēku embriju nieru) šūnu dzīvotspēja arī samazinājās nedaudz līdzīgi kā HELA šūnām. Nav redzama sakarība starp efektu un lunasīna koncentrāciju.



3.4. att. Lunasīna efekti uz dzīvo PA1 (p21) šūnu skaitu, inkubējot 48 stundas.

\*  $p < 0.05$

PA1 (cilvēku olnīcu teratokarcinomas) šūnās lunasīns uzrādīja citotoksicitāti vislielākajā koncentrācijā 10  $\mu\text{M}$ , atstājot dzīvas 86,85% šūnas, salīdzinot ar kontroli. Ir redzama sakarība starp lunasīna koncentrāciju un izraisīto citotoksisku efektu.



3.5. att. Lunasīna efekti uz dzīvo SH-SY5Y (p16) šūnu skaitu, inkubējot 48 stundas.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. kontrole.

SH-SY5Y (cilvēku neuroblastomas) šūnās lunasīns uzrādīja vislielāko citotoksicitāti no visām testētām šūnu līnijām. 1  $\mu$ M koncentrācijā palika dzīvas tikai 73.6% šūnu, salīdzinot ar kontroli. Arī ir redzama sakarība starp izraisīto citotoksicitāti un lunasīna koncentrāciju.

Salīdzinot šos rezultātus ar citiem lunasīna citotoksicitātes pētījumiem, ir redzams, ka šīs šūnu līnijas līdz šim vēl netika pētītas citotoksicitātes testos. Līdz šim lunasīns ir izrādījis citotoksisku efektu L1210 leukēmijas šūnās (11), KM12L4, RKO, HCT-116, HT-29 resnās zarnas vēža šūnās (50) un MDA-MB-231 krūts vēža šūnās (52). Bet tālākā izpēte ir nepieciešama.

Ir izstrādāta lunasīna kvantitatīvās noteikšanas ELISA metode, kas attiecīgi darba gaitai ļauj viegli noteikt lunasīnu koncentrācijā no 20 līdz 120 ng/ml. Izstrādātā ELISA metode ir viegla, precīza un diezgan ātra. Šīs kvalitātes ļauj to pielietot *in vitro* un īpaši *in vivo* pētījumos, kur ir nepieciešama augsta jutība. Mūsu universitātē tas ļaus turpināt lunasīna izpēti. Iegūtie dati par lunasīna atgūstamību no peļu audu homogenātiem ir vērtīgi. Ir apstiprināta lunasīna iespējamā akumulācija vai palēnināts metabolisms peļu nieru audos. Tas atbilst citu pētnieku publicētiem pētījumiem un pierāda metodes darbību. Rēķinoties ar to vajag turpināt lunasīna izpēti. To perspektivitāti apstiprina arī citu pētnieku aktīva darbība šī peptīda pētīšanā, galvenokārt tā pretvēža īpašību virzienā. MTT testā lunasīnam pārbaudījām citotoksisko efektu pret dažādām šūnu līnijām - dzemdes kakla vēža, neuroblastomas, olnīcu teratokarcinomas un cilvēka embrija nieru šūnu līnijām. Šī rezultāti parādīja, ka lunasīns izraisa citotoksicitāti neuroblastomas un olnīcu teratokarcinomas šūnu līnijās. Šie rezultāti ir jāapstiprina veicot tālākos pētījumus, jo līdz šim vēl nav publicētu datu par lunasīna ietekmi uz šīm šūnu līnijām.

Lunasīns ir ļoti perspektīva viela gan pētījumiem, gan pielietošanā. Ņemot vērā, ka šī viela atrasta vairākos augos un pārtikas produktos, šie un turpmākie pētījumi ne tikai pietuvinās jauno zāļu vielu izveidi, bet arī motivēs cilvēkus lietot veselīgu pārtiku.

## SECINĀJUMI

1. Izstrādātā lunasīna kvantitatīvās noteikšanas ELISA metode ļauj izmērīt lunasīnu 20-120 ng/ml koncentrācijā.
2. Lunasīns peļu audos metabolizējas un eksperimentos bez proteāžu inhibitoriem ir izmērāms tikai nierēs.
3. Lunasīns nav toksisks cilvēka normālām HEK293 šūnām un HeLa vēža šūnu līnijai, PA1 šūnu līnijā uzrāda toksicitāti koncentrācijā 10  $\mu$ M, bet neiroblastomas šūnu līnijā SH-SY5Y uzrāda vislielāko toksicitāti, samazinot dzīvo šūnu skaitu visā pētīto lunasīna koncentrāciju diapazonā.
4. Lunasīns nevienā šūnu līnijā neuzrādīja ar rotenonu salīdzināmu toksicitāti.

## PATEICĪBAS

Pateicos par palīdzību bakalaura darba tapšanā Kasparam Jēkabsonam, Anetei Laizānei, Marijai Vaņinai un Lindai Klimavičiusai, Farmakoloģijas katedras pētniekiem.

Ipašu pateicību vēlos izteikt savai darba vadītājai Prof. Rutai Mucenieci.

Lunasīna ELISA kvantitatīvās noteikšanas metodes izstrāde tika realizēta ar LU studentu padomes rīkotajā zinātnisko projektu konkursā iegūto finansējumu.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI

1. **Ben O. de Lumen.** Lunasin: A Cancer-Preventive Soy Peptide. *Nutrition reviews*, 2005, Vol. 63, N. 1, p. 16-21.
2. **Alfredo F. Galvez, Fu Chunjiang, Jim Porter, et al.** Epigenetic Regulation of HMG-CoA Reductase and LDL Receptor Expression By The Soy Peptide Lunasin Provides Mechanism for Lowering Cholesterol. [Tiešsaite: <http://lunasin.com/ScientificResearch/LunasinResearchAbstracts.aspx#AnchorFortyOne>]
3. **V. P. Dia, B. O. de Lumen, E. Gonzales de Mejia, et al.** Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, 2009, vol. 114, p. 108-115.
4. **Ruta Muceniece, Ilva Nakurte, Kristaps Klavins, Inga Kirhnere, Jana Namniece, Liene Adlere, Jaroslavs Matvejevs, Arta Kronberga, Aina Kokare, Vija Strazdina, Linda Legzdina.** Discovery of lunasin peptide in triticale (*X Triticosecale Wittmack*). *Journal of Cereal Science*. [nepublicēts]
5. **Seber L. E., Barnett B. W., McConnell E. J., Hume S. D., Cai J., Boles K., Davis K. R.** Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin Peptide from soybean. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, N. 4, e35409. [Tiešsaite: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0035409>]
6. **Cavazos A., Morales E., Dia V. P., De Mejia E.G.** Analysis of lunasin in Commercial and Pilot Plant Produced Soybean Products and an Improved Method of lunasin Purification. *Journal of Food Science*, 2012. [nepublicēts]
7. **Kyle S., James K. A., McPherson M. J.** Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microbial Cell Factories*, 2012, Vol. 11, N. 1, p. 28.
8. **Galvez, A.F., Revilleza M. J. R., de Lumen, B. O.** A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA. *Plant Physiology*, 1997, Vol. 114, p. 1567-1569.
9. **Chia-Chien Hsieh, Blanca Hernández-Ledesma, Ben O. de Lumen.** Lunasin, a New Breast Cancer Chemopreventive Seed Peptide. **In:** *Soybean and Health*. 2011, InTech, p. 216-231.

10. **Galvez A. F., de Lumen B. O.** A soybean cDNA encoding a chromatin binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 1999, Vol. 17, N. 5, p. 495-500.
11. **Blanca Hernandez-Ledesma, Chia-Chien Hsieh, Vermont Dia.** Lunasin, a new cancer preventive seed peptide. **In: Soybean and Health.** 2011, InTech, p. 146-158.
12. **Ruoslahti E., Pierschbacher M. D.** Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. *Cell*, 1986, Vol. 44, N. 4, p. 517-518.
13. **Akiyama S. K., Aota S., Yamada K. M.** Function and receptor specificity of a minimal 20-Kilodalton cell adhesive fragment of fibronectin. *Cell Adhesion and Communication*, 1995, Vol. 3, N. 1, p. 13-25.
14. **Anuhadra C. D., Kanno S., Hirano S.** RGD peptide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells required caspase-3 activation. *Cell Biology and Toxicology*, 2000, Vol. 16, N. 5, p.275–83.
15. **Matsuki K., Sasho T., Nakagawa K., et. al.** RGD peptide-induced cell death of chondrocytes and synovial cells. *Journal of Orthopaedic Science*, 2008, Vol. 13, N. 6, p. 524-532.
16. **Galvez A. F., Chen N., Macasieb J., de Lumen B. O.** Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation. *Cancer Research*, 2001, Vol. 61, N. 20, p. 7473-7478.
17. **Lam Y., Galvez A. F., de Lumen B. O.** Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines. *Nutrition and Cancer*, 2003 Vol. 47, N. 1, p. 88-94.
18. **Wang W., Dia V. P., Vasconez M., Nelson R. L., de Mejia E G.** Analysis of soybean protein-derived peptides and the effect of cultivar, environmental conditions, and processing on lunasin concentration in soybean and soy products. *Journal of AOAC International*, 2008, Vol. 91, N. 4, p. 936-946.
19. **Elvira gonzalez de Mejia, Miguel Vasconez, Ben O. de Lumen, Randall Nelson.** Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products. *Journal of Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, Vol. 52, p. 5882-5887.
20. **Jeong H.J., Jeong J.B., Hsieh C.C., Hernández-Ledesma B., de Lumen B.O.** Lunasin is prevalent in barley and is bioavailable and bioactive in *in vivo* and *in vitro* studies. *Nutrition and cancer*, 2010, Vol. 62, N. 8, p. 1113-1119.
21. **Chia-Chien Hsieh, Blanca Hernández-Ledesma, Hyun Jin Jeong, Jae Ho Park, Ben O. de Lumen.** Complementary Roles in Cancer Prevention: Protease Inhibitor

- Makes the Cancer Preventive Peptide Lunasin Bioavailable. *PlosOne*, 2010, Vol. 5, N. 1, e8890. [elektronisks žurnāls] [Pieejams: <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0008890>] [atverts 05.05.2012]
22. **Kennedy A. R., Szuhaj B. F., Newberne P. M., Billings P. C.** Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. *Nutrition and Cancer*, 1993, Vol. 19, p. 281–302.
  23. **Clemente A., Gee J. M., Johnson I. T., MacKenzie D. A., Domoney C.** Pea (*Pisum sativum* L.) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, Vol. 53, p. 8979–8986.
  24. **Losso J. N.** The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk Inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, Vol. 48, p. 94–118.
  25. **de Mejia, E. G., Dia, V. P.** The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metastasis Review*, 2010, Vol. 29, N. 3, p. 511-528.
  26. **Ye X., Ng T. B.** A trypsin-chymotrypsin inhibitor with antiproliferative activity from small glossy black soybeans. *Planta Medica*, 2009, Vol. 75, N. 5, p. 550-556.
  27. **Park O. J., Surh Y-H.** Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicology Letters*, 2004, Vol. 150, N. 1, p. 43-56.
  28. **Banerjee S., Li Y., Wang Z., Sarkar F. H.** Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*, 2008, Vol. 269, N. 2, p. 226-242.
  29. **de Mejia E. G., Bradford T., Hasler C.** The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutrition Reviews*, 2003, Vol. 61, N. 7, p. 239-246.
  30. **Park J. H., Ryu C. S., Kim H. N., Na Y. J., Park H. J., Kim H.** A sialic acid-specific lectin from the mushroom *Paecilomyces Japonica* that exhibits hemagglutination activity and cytotoxicity. *Protein & Peptide Letters*, 2004 Vol. 11, No. 6, p. 563-569.
  31. **Kennedy A. R.** The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *Journal of Nutrition*, 1995, Vol. 125, p. 733-743.
  32. **Xiao C. W.** Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *Journal of Nutrition*, 2008, Vol. 138, N. 6, p.1244-1249.
  33. **Paucar-Menacho L. M., Berhow M. A., Mandarino J. M. G., de Mejia E. G., Chang Y. K.** Optimisation of germination time and temperature on the concentration

- of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology. *Food Chemistry*, 2010, Vol. 119, N. 2, p. 636-642.
34. **de Mejia E., Dia V. P.** Chemistry and biological properties of soybean peptides and proteins. **In: Chemistry, Texture and Flavor of Soy. K. Cadwallader et al.**, American Chemical Society, 2010, p. 133-154.
  35. **Park J. H., Jeong H. J., de Lumen B. O.** Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, Vol. 53, N. 20, p. 7686-7690.
  36. **Hernández-Ledesma B., Hsieh C.-C., de Lumen B. O.** Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods. *Food Chemistry*, 2009 Vol. 115, N. 2, p. 574-580.
  37. **Panthee D. R., Kwanyuen P., Sams C. E., et. al.** Quantitative trait loci for β-conglycinin (7S) and glycinin (11S) fractions of soybean storage protein. *Journal of the American Oil Chemists*, 2004, Vol. 81, p. 1005-1012.
  38. **Ji M. P., Cai T. D., Chang K. C.** Tofu yield and textural properties from three soybean cultivars as affected by ratios of 7S and 11S proteins. *Journal of Food Science*, 1999, Vol. 64, p. 763-767.
  39. **Vermont P. Dia, Ben O. de Lumen, Elvira Gonzalez de Mejia, et. al.** Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, Vol. 57, N. 4, p. 1260-1266.
  40. **Jeong J. B., Jeong H. J., Park J. H., Lee, S. H., Lee, J. R., Lee H. K., Chung G. Y., Choi J. D., de Lumen, B. O.** Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum L.* inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, Vol. 55, N. 26, p. 10707-10713.
  41. **Silva-Sánchez C., de la Rosa A. P., León-Galván M. F., de Lumen B.O., de León-Rodríguez A., de Mejía E.G.** Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, Vol. 56, N. 4, p. 1233-1240.
  42. **Chin-Feng Liu, Tzu-Ming Pan.** Recombinant expression of bioactive peptide lunasin in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, Vol. 88, N. 1, p. 177-186.
  43. **Martin G. A., Kawaguchi R., Lam Y., et. al.** High-yield, *in vitro* protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/translation system. *Biotechniques*, 2001, Vol. 31, p. 948-953.

44. **Jeong H. J., Jeong J. B., Kim D. S., de Lumen B. O.** Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide lunasin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, Vol. 55, N. 3, p. 632-637.
45. **Park J. H., Jeong H. J., de Lumen B. O.** In vitro digestibility of the cancer-preventive soy peptides lunasin and BBI. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, Vol. 55, N. 26, p. 10703-10706.
46. **Jeong H. J., Lee J. R., Jeong J. B., Park J. H., Cheong Y. K., de Lumen B. O.** The Cancer Preventive Seed Peptide Lunasin From Rye Is Bioavailable and Bioactive. *Nutrition and Cancer*, 2009, Vol. 61, N. 5, p. 680-686.
47. **Hsieh C.-C., Hernández-Ledesma B., de Lumen B. O.** Lunasin-aspirin combination against NIH/3T3 cells transformation induced by chemical carcinogens. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2011. [nerepublicēts]
48. **Jeong, H.J.; Park, J.H.; Lam, Y. & de Lumen, B.O.** Characterization of lunasin isolated from soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, Vol. 51, N. 27, p. 7901-7906.
49. **Helt A. M., Galloway D. A.** Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis*, 2003, Vol. 24, N. 2, p. 159-169.
50. **Dia V. P., de Mejia E. G.** Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in human metastatic colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, Vol. 55, N. 4, p. 623-634.
51. **Hsieh, C.-C.; Hernández-Ledesma, B. & de Lumen, B.O.** Lunasin, a novel seed peptide, sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to aspirin-arrested cell cycle and induced-apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, Vol. 186, N. 2, p. 127-134.
52. **Wang, W.; Bringe, N.A.; Berhow, M.A. & de Mejia, E.G.** b-Conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, Vol. 56, N. 11, p. 4012-4020.
53. **Hsieh E. A., Chai C. M., de Lumen B. O., Neese R. A., Hellerstein M. K.** Dynamics of keratinocytes in vivo using (H<sub>2</sub>O)-H<sup>2</sup> labeling: a sensitive marker of epidermal proliferation rate. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2004, Vol. 123, N. 3, p. 530-536.

54. **Hsieh C.-C., Hernández-Ledesma B., de Lumen B. O.** Soybean peptide lunasin suppresses in vitro and in vivo 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced tumorigenesis. *Journal of Food Science*, 2010, Vol. 75, N. 9, p. 311- 316.
55. **Hernández-Ledesma B., Hsieh C.-C. de Lumen B. O.** Anti-inflammatory and antioxidant properties of peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, Vol. 390, N. 3, p. 803- 808.
56. **de Mejia E. G. Dia V. P.** Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kB pathway in the macrophage. *Peptides*, 2009, Vol. 30, N. 12, p. 2388-2398.
57. **Jeong J. B., de Lumen B. O., Jeong H. J.** Lunasin peptide purified from *Solanum nigrum* L. protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Letters*, 2010, Vol. 293, N. 1, p. 58-64.
58. **Li Y. W., Ahmed F., Ali S., Philip P. A., Kucuk O., Sarkar F. H.** Inactivation of nuclear factor B by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Research*, 2005, Vol. 65, N. 15, p. 6934-6942.
59. **de Kok T. M., van Breda S. G., Manson M. M.** Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *European Journal Nutrition*, 2008, Vol. 47, N. 2, p. 51-59.
60. **Im J. Y., Park H., Kang K. W., Choi W. S., Kim H. S.** Modulation of cell cycles and apoptosis by apicidin in estrogen receptor (ER)-positive and-negative human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, Vol. 172, N. 3, p. 235-244.
61. **Dwarakanath B. S., Verma A., Bhatt A. N., Parmar V. S, Raj H. G.** Targeting protein acetylation for improving cancer therapy. *Indian Journal of Medicinal Research*, 2008, Vol. 128, N. 1, p. 13-21.
62. **Dalvai M., Bystricky K.** The role of histone modifications and variants in regulating gene expression in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2010, Vol. 15, N. 1, p. 19-33.
63. **Jeong H. J., Lam Y., de Lumen B.O.** Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, Vol. 50, N. 21, p. 5903-5908.
64. **Jeong H. J., Jeong J. B., Kim D. S., Park J. H., Lee J. B., Kweon D. H., Chung G. Y., Seo E. W., de Lumen B.O.** The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters*, 2007, Vol. 255, N. 1, p. 42-48.

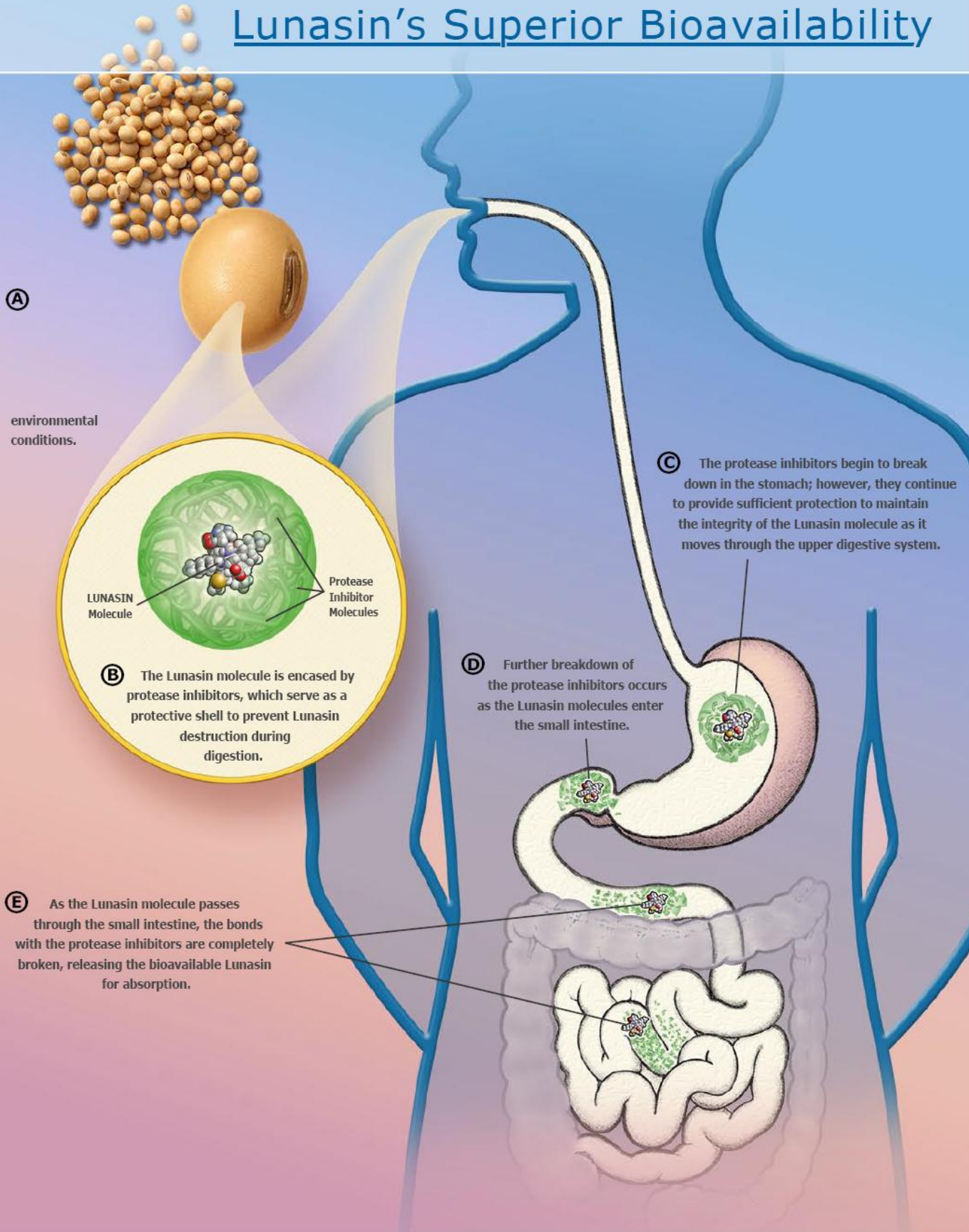
65. **Strahl B. D., Allis C. D.** The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, Vol. 403, N. 6765, p. 41-45.
66. **Fraga M. F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., et. al.** Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 2005 Vol. 37, N. 4, p. 391-400.
67. **Sutherland R. L. Musgrove E. A.** Cyclins and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2004, Vol. 9, N. 1, p. 95-104.
68. **Hsieh C.-C., Hernández-Ledesma B., de Lumen B. O.** Cell proliferation inhibitory and apoptosis inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Food Chemistry*, 2011, Vol. 125, N. 2, p. 630-636.
69. **Hernández-Ledesma B., Hsieh C.-C., de Lumen B. O.** Relationship between lunasin's sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, Vol. 55, N. 7, p. 989-998.
70. **Gayther S. A., Batley S. J., Linger L., Bannister, A., et. al.** Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nature Genetics*, 2000, Vol. 24, N. 3, p. 300-303.
71. **Dia V. P., de Mejia E. G.** Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in human metastatic colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, Vol. 55, N. 4, p. 623-634.

## Pielikums 1

Sample No.	Type of sample	Composition-main ingredients	Country	Lunasin (mg/100 g product)	BBI (mg/100 g product)
Soy milk-1	Enriched soymilk	Soybeans	USA	15.7 ± 1.3	33.1 ± 4.2
Soy milk-2	Organic original soymilk	Soybeans, malted wheat and barley extract	USA	18.9 ± 2.6	27.1 ± 3.4
Soy milk-3	Organic fortified soymilk	Soybeans, malted wheat and barley extract	USA	14.2 ± 1.1	24.7 ± 4.3
Soy milk-4	Organic plain soymilk	Soybeans	USA	13.8 ± 2.6	45.7 ± 7.2
Soy milk-5	Organic unsweetened soymilk	Soybeans	USA	14.4 ± 2.4	55.9 ± 5.0
Soy milk-6	Organic plain soymilk	Soybeans	USA	14.7 ± 0.8	40.0 ± 5.5
Soy milk-7	Organic original soymilk	Soybeans, rice syrup	USA	13.7 ± 0.9	30.3 ± 3.7
Soy milk-8	Organic plain soymilk	Soybeans, soy protein isolate	USA	13.9 ± 1.0	25.9 ± 4.2
Soy milk-9	Organic original soymilk	Soybeans, malt syrup	USA	18.3 ± 2.4	23.1 ± 3.0
Soy milk-10	Organic original soy drink	Soybeans, barley extract	USA	10.7 ± 0.8	7.2 ± 1.5
Soy milk-11	Fortified soymilk	Soybeans	USA	12.3 ± 0.8	18.8 ± 2.7
Soy milk-12	Unsweetened soymilk	Soybeans	Singapore	11.8 ± 1.3	n.d.
Soy formula-1	Soy-based formula	Corn syrup, soy protein isolate	USA	4.1 ± 0.4	n.d.
Soy formula-2	Organic soy formula	Corn syrup, soy protein	USA	2.8 ± 0.2	n.d.
Soy formula-3	Organic soy formula	Rice syrup, soy protein concentrate	USA	1.5 ± 0.1	n.d.
Tofu-1	Soft Tofu	Soybeans	USA	9.62 ± 0.87	4.63 ± 1.76
Tofu-2	Soft Tofu	Soybeans	USA	7.34 ± 1.04	3.72 ± 0.21
Tofu-3	Silken Tofu Kinugoshi	Soybeans	USA	9.60 ± 0.74	12.41 ± 2.11
Tofu-4	Silken Tofu	Soybeans	USA	4.41 ± 0.49	11.87 ± 1.53
Tofu-5	Silken Tofu	Soybeans	USA	3.69 ± 0.49	5.92 ± 1.15
Tofu-6	Medium firm Tofu	Soybeans	USA	14.30 ± 1.80	4.91 ± 0.53
Tofu-7	Organic Medium firm Tofu	Soybeans	USA	6.66 ± 1.29	4.19 ± 0.54
Tofu-8	Firm Tofu	Soybeans	USA	3.50 ± 0.23	8.23 ± 0.58

Sample No.	Type of sample	Composition-main ingredients	Country	Lunasin (mg/100 g product)	BBI (mg/100 g product)
Tofu-9	Extra firm tofu Chinese style	Soybeans	USA	3.66 ± 0.12	4.57 ± 0.55
Tofu-10	Baked tofu	Soybeans, soy sauce (wheat)	USA	5.47 ± 0.34	2.94 ± 0.48
Tofu-11	Fried tofu	Soybean, soybean oil, soy sauce	USA	0.37 ± 0.05	n.d.
Tofu-12	Dry tofu	Soybeans	Taiwan	2.50 ± 0.27	n.d.
Natto-1	Natto	Fermented soybeans ( <i>Bacillus subtilis</i> natto)	Japan	n.d.	n.d.
Miso-1	Organic Miso	Soybeans, rice, <i>Aspergillus oryzae</i>	Japan	n.d.	n.d.
Tempeh-1	Organic soy tempeh	Soybeans, <i>Rhizopus oligosporus</i>	USA	n.d.	n.d.
Tempeh-2	Organic soy tempeh	Soybeans, brown rice, <i>R. oligosporus</i>	USA	8.19 ± 0.42	n.d.
Tempeh-3	Organic soy tempeh-flax	Soybeans, flaxseed, brown rice, <i>R. oligosporus</i>	USA	6.12 ± 0.40	n.d.
Tempeh-4	Organic soy tempeh-rice	Soybeans, brown rice, <i>R. oligosporus</i>	USA	n.d.	n.d.
Bean curd-1	Marinated bean curd	Soybeans, soy sauce	Taiwan	9.53 ± 1.01	14.65 ± 0.60
Bean curd-2	Soybean curd noodle	Soybeans	Taiwan	n.d.	n.d.
Soybean cake-1	Deep fried soybean cake	Soybeans, soybean oil	USA	1.91 ± 0.25	6.57 ± 0.41
Soybean cake-2	Baked soybean cake	Soybeans, soy sauce, sesame oil	USA	1.14 ± 0.15	0.73 ± 0.05

## Lunasin's Superior Bioavailability



Dokumentārā lapa

Bakalaura darbs „Lunasīna biostabilitāte un citotoksicitāte in vitro testos  
izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autors: Jaroslavs Matvejevs

Paraksts:

Darba vadītāja: Dr. hab. biol., profesore Ruta Muceniece

Paraksts:

Recenzente: Dr.farm. Kristīne Saleniece

Paraksts:

Darbs iesniegts:

Darbu pieņēma:

/Juta Bārtule/