

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

***VACCINIUM SPP.* OGU IZSPIEDU EKSTRAKTU
PRETIEKAISUMA ĪPAŠĪBAS**

BAKALaura DARBS

Autors: **Marta Silavniece**

Studenta apliecības Nr.: ms17104

Darba vadītājs: prof. Dr. habil. biol. Ruta Muceniece

RĪGA 2020

ANOTĀCIJA

Ilgstošs iekaisums ir būtisks faktors hronisku slimību attīstībā, taču vēl joprojām nav pieejami pilnībā droši pretiekaisuma līdzekļi, tādēļ pasaulē pieaug interese par dabīgas izcelsmes savienojumiem ar pretiekaisuma īpašībām. *Vaccinium* ģints ogas pazīstamas ar augstu bioloģisko aktivitāti un labvēlīgu ietekmi uz cilvēku veselību, pateicoties augstam polifenolu saturam. Šobrīd ogu izspiedas tiek pētītas kā alternatīvs fitoķīmisko savienojumu avots ar veselību veicinošu potenciālu. Darba mērķis ir izpētīt piecu *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu pretiekaisuma īpašības, izmantojot lipoksigenāzes (5-LOX), ciklooksigenāzes (COX-1) un ksantīna oksidāzes inhibitoru skrīninga testus. Melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, purva dzērveņu un brūkleņu ekstrakti no koncentrācijas atkarīgā veidā inhibēja 5-LOX, COX-1 un ksantīna oksidāzes aktivitāti. Konstatēta arī sakarība starp inhibējošo efektu un ekstraktu kopējo polifenolu un antocianīnu saturu. Iegūtie rezultāti liecina, ka ogu izspiedu ekstraktiem ir *in vitro* pretiekaisuma īpašības.

Atslēgas vārdi: *Vaccinium spp.* izspiedu ekstrakti, iekaisums, 5-LOX, COX-1, ksantīna oksidāze

ABSTRACT

Prolonged inflammation is a major factor in the development of chronic diseases, however, completely safe anti-inflammatory drugs are still not available, leading to a growing global interest in compounds with natural anti-inflammatory properties. Berries of the genus *Vaccinium* are known for their high biological activity and beneficial effects on human health due to their high content of polyphenols. Berry pomaces are currently being studied as an alternative source of phytochemical compounds with health-promoting potential. The aim of this work was to study anti-inflammatory properties of five berry pomace extracts using screening tests for lipoxygenase (5-LOX), cyclooxygenase (COX-1) and xanthine oxidase inhibitors. Bilberry, highbush blueberry, American cranberry, bog cranberry and lingonberry extracts inhibited 5-LOX, COX-1 and xanthine oxidase activity in a concentration-dependent manner. A relationship between the inhibitory effect and the total polyphenol and anthocyanin content of the extracts was also found. The obtained results show that berry pomace extracts possess *in vitro* anti-inflammatory properties.

Key words: *Vaccinium spp.* pomace extracts, inflammation, 5-LOX, COX-1, xanthine oxidase

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS.....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Iekaisums	9
1.2. Iekaisuma mediatori	10
1.2.1. Arahidonskābes metabolisms	11
1.2.2. COX ceļš.....	12
1.2.3. LOX ceļš.....	13
1.2.3. CYP450 un izoprostona ceļš.....	14
1.3. Ksantīna oksidāze	15
1.4. Polifenoli	16
1.4.1. Flavonoīdu pretiekaisuma īpašības.....	17
1.4.2. Antocianīnu pretiekaisuma īpašības	21
1.5. Melleņu ģints (<i>Vaccinium spp.</i>).....	23
1.5.1. Mellenes (<i>Vaccinium myrtillus L.</i>)	23
1.5.2. Krūmmellenes (<i>Vaccinium corymbosum L.</i>).....	24
1.5.3. Lielogu dzērvenes (<i>Vaccinium macrocarpon Ait.</i>) un purva dzērvenes (<i>Vaccinium oxycoccos L.</i>).....	26
1.5.4. Brūklenes (<i>Vaccinium vitis-idaea L.</i>).....	27
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	29
2.1. Materiāli.....	29
2.1.1. Reāģenti, materiāli un palīgvielas	29
2.1.2. Aparatūra	30
2.2. Metodes	30
2.2.1. 5-LOX inhibitoru skrīnings	30
2.2.2. COX-1 inhibitoru skrīnings	31
2.2.3. Ksantīna oksidāzes inhibitoru pētīšanas metode	32
2.3. Datu statistiskā analīze	33
3. REZULTĀTI	34
3.1. 5-LOX aktivitātes inhibīcija	34
3.2. COX-1 aktivitātes inhibīcija	37
3.3. Ksantīna oksidāzes aktivitātes inhibīcija	39
4. DISKUSIJA	41

SECINĀJUMI	46
PATEICĪBAS	47
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	48
DOKUMENTĀRĀ LAPA	57

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AS – arahidonskābe
cAMF - cikliskais adenozinmonofosfāts
CRP – C reaktīvais proteīns
COX – ciklooksigenāze
CYP450 – citohroms P-450
CysLT – cisteīna leikotriēni
EET – epoksieikozatrienoīnskābe
FL –fosfolipāze
HETE – hidroksieikozatetrēnskābe
HPETE – hidroperoksieikozatetrēnskābe
IL – interleikīns
NOS – slāpekļa oksīda sintāze
IsoPS – izoprostoni
LOX – lipoksigenāze
LT – leikotriēni
LX – lipoksīni
MAPK – mitogēna aktivētas proteīnkināzes
NF-κB – kodola transkripcijas faktors κB
NPL – nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi
PBS – fosfāta buferēts šķīdums
PDE – fosfodiesterāze
PG – prostaglandīns
PGI₂ – prostaciklīns
ROS – reaktīvās skābekļa sugas
RFU – relatīvās fluorescences vienības
TNF-α – audzēja nekrozes faktors alfa
TX – tromboksāns
XDR – ksantīna dehidrogenāze
XO – ksantīna oksidāze
XOR – ksantīna oksidoreduktāze

IEVADS

Iekaisums ir sarežģīts un būtisks imūnās sistēmas aizsargmehānisms pret kaitīgiem stimuliem, kā patogēni, bojātas šūnas un toksiski savienojumi. Vairumā gadījumu iekaisums ir specifiska un paškontrolēta reakciju kaskāde ar mērķi samazināt karinājumu un veicināt dzīšanu (Maleki *et al.*, 2019). Kamēr akūts, lokāls iekaisums ir daļa no imūnās atbildes un tiek uzskatīts par vitāli svarīgu un vēlamu, hronisks, sistemātisks iekaisums ir saistīts ar daudzu slimību patogēnēzi (Vendrame and Klimis-Zacas, 2015). Hronisks iekaisums kļūst par pašplūstošu procesu, kura novēršanai nepieciešama medicīniska iejaukšanās, lai kontrolētu vai apturētu tālākus bojājumus, turklāt, tam ir būtiska loma slimību attīstībā, tostarp metabolā sindroma, sirds un asinsvadu slimību, otrā tipa diabēta, vēža un neurodeģeneratīvu saslimšanu (Vendrame and Klimis-Zacas, 2015; Sala *et al.*, 2018).

Būtiska daļa no procesa regulācijas ir iekaisuma mediatoru, kas ierosina, uztur un kontrolē imūno atbildi (Galvão *et al.*, 2018). Iekaisumu veicinošo enzīmu ciklooksigenāzes (COX) un lipoksigenāzes (LOX), modulācija ir viens no svarīgākajiem mehānismiem, tādējādi samazinot mediatoru izdalīšanu un apturot signālu kaskādi.

Iekaisums un sāpes ir globāla veselības problēma, tāpēc miljoniem cilvēku izmanto nesteroidos pretiekaisuma līdzekļus (NPL). Taču hroniska zāļu lietošana saistāma ar nopietnām komplikācijām, tādēļ pieaug interese pēc augu izcelsmes savienojumiem ar līdzīgu darbību (Sala *et al.*, 2018). Turklāt iekaisumā liela nozīme ir ne tikai ģenētiskiem faktoriem, bet arī uzturam, kas var būtiski ietekmēt dažādus iekaisuma komponentus un slimības (Maleki *et al.*, 2019).

Ogas ir bagātas ar fitoķīmiski aktīviem savienojumiem ar veselību veicinošu potenciālu. To pārstrādes procesā veidojas aptuveni 20-30% nevajadzīga blakusprodukta – izspiedu, kas satur lielu daudzumu šķiedrvielu un bioloģiski aktīvu savienojumu, bez tam ogās un arī to izspiedās ir salīdzinoši zems pesticīdu līmenis (Reißner *et al.*, 2019). Sulu ražošanā radušās ogu izspiedas uzskata par lētu alternatīvu vērtīgu bioķīmiski aktīvu vielu iegūšanai (Laroze *et al.*, 2010). Piemēram, 30—50% no svaigu melleņu procianidīniem paliek izspiedās, rezultātā tiek zaudēti savienojumi ar perspektīvu uzlabot veselību. Efektīva sulu izspiedu izmantošana var būt pamats jauniem veselību veicinošiem produktiem, kā arī veids kā neizslēgt no barības ķēdes virkni vērtīgu fitoķīmisko vielu (Struck *et al.*, 2016). Turklāt šo it kā atkritumvielu tālāka izmantošana sniedz ilgstspējīgu un labai draudzīgu risinājumu (Laroze *et al.*, 2010).

Vaccinium spp. (Ericaceae) pārstāv vairāk nekā 450 dažādu krūmu un liānu. Ģintij pieder gan savvaļas sugas, gan ekonomiski nozīmīgas šķirnes ar lielu polifenolu – flavonoīdu un antocianīnu – daudzumu, kas pazīstami ar nozīmīgām antioksidantu, pretiekaisuma,

pretvēža, vazoprotektīvām un antivirālām īpašībām. Augus plaši izmanto pārtikā un kā farmaceitiskās rūpniecības izejvielas, un šobrīd vairākas *Vaccinium* ogas tiek izmantotas kā uztura bagātinātāji (Su, 2012).

Ņemot vērā, ka izspiedās paliek daļa bioloģiski aktīvo savienojumu, ir pamats domāt, ka *Vaccinium* ogu izspiedām ir liels potenciāls izmantošanai farmaceitiskajā rūpniecībā, lai stiprinātu cilvēka veselību. Balstoties uz zinātnisko literatūru par ogu pretiekaisuma īpašībām un 2019. gadā publicētu pētījumu, kas apstiprina *Vaccinium spp.* izspiedu ekstraktu antioksidatīvās, hipoglikēmiskās un hepatoprotektīvās īpašības *in vitro* (Muceniece *et al.*, 2019), radās interese pētīt melleņu, krūmmelleņu, brūkleņu, lielogu un purva dzērveņu ekstraktu pretiekaisuma īpašības.

Darba mērķis: izpētīt piecu *Vaccinium* ģints ogu – melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, purva dzērveņu un brūkleņu – izspiedu ekstraktu *in vitro* pretiekaisuma īpašības.

Darba uzdevumi:

1. Noskaidrot *Vaccinium* ģints ogu izspiedu ekstraktu ietekmi uz 5-lipoksigenāzes enzīma aktivitāti.
2. Pētīt ekstraktu efektu uz ciklooksigenāzes-1 enzīmātisko aktivitāti.
3. Noskaidrot ekstraktu ietekmi uz ksantīna oksidāzes aktivitāti.
4. Noskaidrot, vai ekstraktu ķīmiskajam sastāvam ir saistība ar pretiekaisuma īpašībām.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Iekaisums

Iekaisums ir tūlītēja, nespecifiska ķermeņa aizsargreakcija uz audu un šūnu bojājumiem. To izraisa virkne kaitīgu stimulu kā mikroorganismi, svešķermeņi, parazīti un audu bojājumi, kam var būt eksogēni (ķīmiski, mehāniski un fizikāli) vai endogēni (audzēja šūnas, autoimūnas reakcijas) iemesli. Iekaisumam raksturīgos simptomus jau 1. gadsimtā senajā Romā formulējis Auls Kornēlijs Celzs latīņu valodā: karstums (*calor*), sāpes (*dolor*), apsārtums (*rubor*), uztūkums (*tumor*). 19. gadsimta beigās pievienoja arī piekto pazīmi: funkciju zudums (*functio laesa*).

Iekaisumu pēc ilguma iedala akūtā un hroniskā. Akūts iekaisums attīstās dažu minūšu vai stundu laikā un atkarībā no audu bojājuma veida un smaguma ilgst no stundām līdz dienām. Bet, ja sākotnējā atbilde nespēj novērst kaitīgo stimulu aptuveni 2 nedēļu laikā, tad procesu var uzskatīt par hronisku iekaisumu (Stephenson, 2013). Nekontrolētam akūtam iekaisumam ir risks kļūt par hronisku, veicinot arī virkni hronisku slimību (Chen *et al.*, 2017).

Akūtam iekaisumam vispārīgi raksturīgi trīs savstarpēji saistīti procesi: asinsvadu dilatācija, palielināta asinsvadu caurlaidība un neitrofilo leukocītu aktivācija un migrācija uz iekaisuma vietu. Uzreiz pēc bojājuma seko arteriolu un kapilāru dilatācija un palielināta asins plūsmu reģionā. Paralēli veidojas spraugas starp vēnulu endotēlija šūnām, ļaujot audos izplūst ar olbaltumvielām bagātai plazmai, ko sauc par eksudātu. Uz endotēlija šūnām palielinās adhēzijas molekulu ekspresija, un plazmā cirkulējošie neitrofili, nonākot saskarsmē ar šīm molekulām, piestiprinās un transmigrē iekaisuma virzienā (Stephenson, 2013). Procesu, kas veicina šūnu migrāciju ķīmisko signālvielu koncentrācijas gradienta virzienā, sauc par hemotaksi (Kumar *et al.*, 2017). Nonākot bojātajā vietā, aktivētie neitrofili fagocitozē nekrotiskos audus un iespējamus patogēnus (Stephenson, 2013).

Bez neitrofilajiem leukocītiem iekaisuma reakcijā no asinīs cirkulējošajā šūnām piedalās arī eozinofīlie leukocīti, limfocīti (naturālās galētājšūnas, T un B šūnas), trombocīti un monocīti, bet audos lokāli aktivizējas tuklās šūnas (Chen *et al.*, 2017). Akūtam iekaisumam ir četri iespējamie iznākumi: pilnīga atveseļošanās, dzišana ar fibrozi, abscesa veidošanās un pāriešana hroniskā iekaisumā (Kumar *et al.*, 2017). Diemžēl iekaisuma šūnas atbrīvo lizosomālos enzīmus un producē virkni iekaisuma mediatoru, kas bojā arī apkārt esošos veselos audus (Stephenson, 2013).

Hronisks iekaisums ne vienmēr seko akūtam iekaisumam, tas var veidoties arī *de novo* un sākotnēji ir maz izteikts un asimptomātisks. Ilgst no nedēļām līdz mēnešiem vai pat

gadiem un procesa raksturīgākas pazīmēs ir makrofāgu infiltrācija, vienlaicīga audu nekroze un audu atjaunošanās caur angiogēnēzi un fibrozi (Ackermann, 2017; Kumar *et al.*, 2017). Hronisks iekaisums ir patstāvīgs process, tādēļ, lai apturētu vai kontrolētu turpmākus bojājumus, nepieciešama medicīniska iejaukšanās (Sala *et al.*, 2018).

Papildus iepriekš minētajām lokālajām pazīmēm akūtam un hroniskam iekaisumam ir arī citokīnu izraisīti sistēmiski efekti. Makrofāgi un neitrofili izdala endogēnos pirogēnus, savienojumus, kas hipotalāmā izmaina termoregulatoros mehānismus un paaugstina ķermeņa temperatūru. Pacienti var novērot sliktu dūšu, vājumu, anoreksiju un svara zudumu, it īpaši hronisku iekaisumu gadījumos. Raksturīgi arī palielināti limfmezgli un hematoloģiskas izmaiņas (Stephenson, 2013).

Lai gan iekaisumam ir aizsargājoša loma ar mērķi nodrošināt audu homeostāzi, iekaisuma reakcijas ir arī daļa no daudzu hronisku slimību patoģenēzes. Iekaisums ir pamats tādām hroniskām slimībām kā reimatoīdais artrīts, plaušu slimības, ateroskleroze u.c. Turklāt iekaisums ir iesaistīts slimību attīstībā, kuras tiek uzskatītas par vielmaiņas, deģeneratīvām vai ģenētiskām slimībām kā vēzis, 2.tipa diabēts, aptaukošanās, kardiovaskulāras un neiroloģiskas saslimšanas (Kumar *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2018). Piemēram, pētījumi apstiprina, ka iekaisuma procesiem ir cieša saistība ar vairākiem ļaundabīgā audzēja aspektiem: audzēja attīstību, angiogēnēzi, metastāžu veidošanos un atkārtotu attīstību (Piotrowski *et al.*, 2020).

1.2. Iekaisuma mediatori

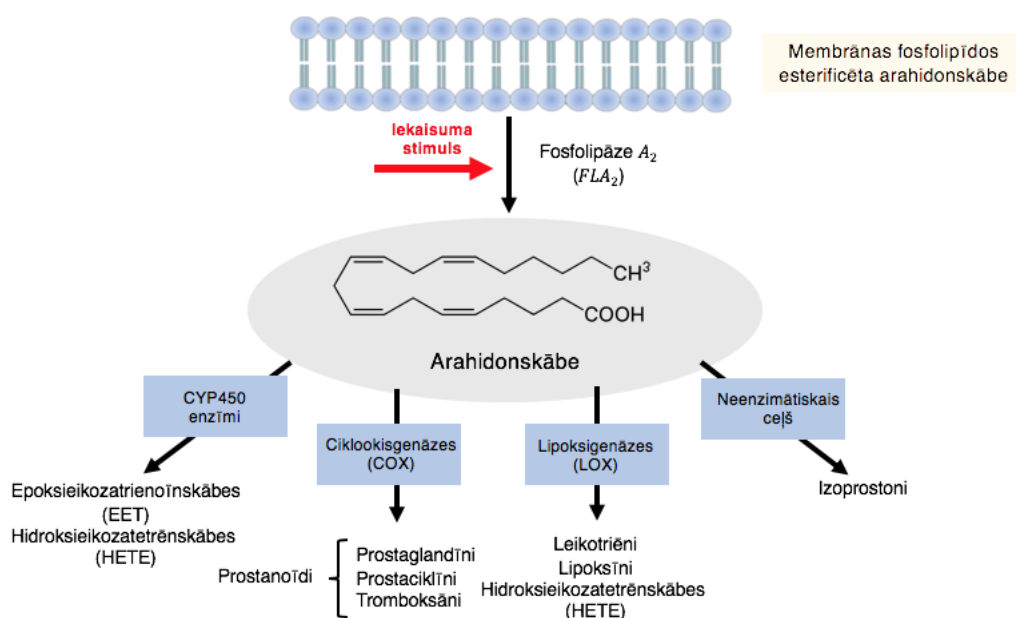
Imūnā sistēma tiek galā ar kaitīgo stimulu caur secīgām molekulārām, celulārām un fizioloģiskām izmaiņām. Lai uzsāktu un koordinētu notikumu kaskādi, iekaisuma vietā esošās šūnas vai asins komponenti izdala iekaisuma mediatorus (Galvão *et al.*, 2018). No šūnām izdalītie mediatori var tikt izdalīti no granulām vai sintezēti *de novo*. Galvenie šūnu veidi, kas tos producē, ir neitrofili, trombocīti, monocīti (makrofāgi) un tuklās šūnas, turklāt fibroblasti, endotēlija un gludās muskulatūras šūnas arī var tikt aktivizētas, lai ražotu daļu no iekaisuma mediatoriem. Plazmas mediatori, kā komplements, kinīni un fibrinolīzes proteīni, lielākoties tiek veidoti aknās un cirkulē neaktīvā prekursoru formā, tādēļ sākumā nepieciešama to aktivācija.

Iekaisuma kaskāde tiek ierosināta tikai nepieciešamības gadījumos, līdzīgi arī mediatori tiek ražoti un izdalīti tikai pēc noteiktu receptoru un signālceļu aktivizācijas. Lielākā daļa no šīm signālmolekulām ir īslaicīgas - tās pašas ātri sadalās, tiek degradētas, savāktas vai inhibētas. Būtiski, ka viens mediators var stimulēt arī citu mediatoru atbrīvošanos. Sekundārie

mediatori var nodrošināt līdzīgu darbību ierosinātajam vai arī pretēju, tādējādi nodrošinot kontroli un balansu (Kumar *et al.*, 2017).

1.2.1. Arahidonskābes metabolisms

Arahidonskābes mediatoru pārprodukcija ir viens no galvenajiem faktoriem daudzu iekaisuma slimību attīstībā (Jaismy *et al.*, 2018). Arahidonskābe (AS) ir 20 oglekļa atomu gara polinepiesātināta taukskābe ar četrām divkāršajām saitēm, kas esterificētā formā ir daļa no šūnas membrānas fosfolipīdiem. Kad šūnas ir pakļautas stresam, AS tiek atbrīvota un oksidēta četros iespējamajos ceļos – ciklooksigenāzes (COX), lipoksigenāzes (LOX), citohroma P-450 (CYP450) enzīmu un neenzimātiskajā izoprostona ceļā (Wang *et al.*, 2019).



1.1. att. Arahidonskābes metabolisms četros iespējamajos ceļos. Attēls ar izmaiņām no (Galvão *et al.*, 2018)

Ir vairākas fosfolipāžu (FL) klases, kas atbildīgas par AS atbrīvošanu. No tām visnozīmīgākā ir fosfolipāze A₂ (FLA₂), precīzāk, kalcija atkarīgā FLA₂, kas aktivējās no palielinātas Ca²⁺ koncentrācijas ķīmisku un fizisku stimulu rezultātā un ar augstu affinitāti saistās ar membrānās iekļauto AS (Buczynski *et al.*, 2009). Brīvā AS kļūst par prekursoru simtiem dažādu iekaisuma mediatoru.

Caur ciklooksigenāzes (COX) ceļu veidojas prostaglandīni (PG), prostaciklīns (PGI₂) un tromboksāns (TXA₂), bet caur lipoksigenāzes (LOX) ceļu rodas leikotriēni (LT) un lipoksīni (LX). Citohroma P450 (CYP450) ceļā sintezējas epoksieikozatrienoīnskābes (EET)

un hidroksieikozatetrēnskābes (HETE) (Wang *et al.*, 2019). Neezimātiska brīvo radikāļu izraisīta AS peroksidācija veido prostaglandīniem līdzīgus savienojumus – izoprostānus (IsoPS), kuriem gan vienīgajiem no AS metabolisma produktiem nav loma iekaisuma procesā (Milne *et al.*, 2011).

Kopumā visus arahidonskābes metabolītus dēvē par eikosanoīdiem (Wang *et al.*, 2019). Eikosanoīdu signālceļiem ir būtiska nozīme ne tikai iekaisuma veidošanā, uzturēšanā un regulācijā, bet arī homeostāzes nodrošināšanā un kardiovaskulāro un reproduktīvo sistēmu darbībā. Disbalanss eikosanoīdu sintēzē noved pie imūnās sistēmas traucējumiem un hroniskas iekaisuma (Buczynski *et al.*, 2009).

1.2.2. COX ceļš

Ciklooksigenāzes ir hēma dzelzi saturoši enzīmi un pamats prostanoīdu - prostaglandīnu (PG), prostaciklīna (PGI₂) un tromboksānu (TX) – sintēzei no AS. Strukturāli tie ir bifunkcionāli enzīmi, jo darbojas gan kā oksigenāze, gan kā peroksidāze. Ciklooksigenāze ir ģenēriskais nosaukums un enzīmus sauc arī par prostaglandīna endoperoksidāzes H sintētāzi-1 un 2 (PGHS-1 un PGHS-2) (Smith *et al.*, 2000).

Lielākoties izšķir divas COX izformas, kuras, lai gan ir līdzīgas aktivitātē, kodē divi dažādi gēni. Šūnās COX-1 ekspresēts konstitutīvi, bet COX-2 ekspresiju inducē dažādi stimuli, tādēļ tiek uzskatīts, ka COX-1 nodrošina homeostāzes veida PG darbību, kā trombocītu agregācija un asinsvadu tonusa regulāciju, savukārt COX-2 veidotie PG stimulē iekaisumu un ir vairāk patofizioloģiski (Rouzer and Marnett, 2009). Smadzenēs un sirdī atklāta arī trešā izfoforma COX-3, kā COX-1 paveids, taču tās funkcijas vēl nav noskaidrotas (Hanna and Hafez, 2018).

Ciklooksigenāzes katalizē pirmos divus biosintēzes soļus, veidojot divpakāpju reakciju. Brīvā AS sākotnēji tiek pārvērsta nestabilā starpposmā – prostaglandīnā G₂ (PGG₂), kas tālāk tiek pārveidots par PGH₂, izmantojot COX peroksidāzes aktivitāti. PGH₂ ir prekursors stabilāku un bioloģiski aktīvu savienojumu – PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ un TXA₂ – sintēzei ar atšķirīgām enzimatiskām sintāzēm (Breyer *et al.*, 2013). COX-1 ceļā rodas PGD₂, PGF_{2α} un TXA₂, bet COX-2 savienojas ar sintāzēm, kas katalizē PGE₂ un PGI₂ veidošanos (Hanna and Hafez, 2018). Reakciju produkti šķērso šūnas membrānu un ekstracelulārajā vidē, aktivē ar G-proteīnu saistītos prostanoīdu receptorus, bet dažos gadījumos arī kodola receptorus (Smith *et al.*, 2000).

PGD₂ ir galvenais tuklo šūnu izdalītais prostaglandīns iekaisuma laikā. Tas izraisa vazodilatāciju un vēnulu caurlaidību, attiecīgi veicinot tūskas veidošanos, kā arī piesaista neitrofilos leukocītus iekaisuma vietai (Joo and Sadikot, 2012; Stephenson, 2013).

PGE₂ jeb prostaglandīnu E₂ uzskata par klasisku iekaisuma mediatoru, jo tas izraisa raksturīgākās pazīmes: apsārtumu, pietūkumu un sāpes. PGE₂ veicina vazodilatāciju un asinsvadu caurlaidību, tāpēc no palielinātas asiņu plūsmas rodas apsārtums un pietūkums. PGE₂, saistoties ar EP₁ receptoru uz perifērajiem sensorajiem neironiem, rada sāpju sajūtu (Legler *et al.*, 2010). Turklāt tas piedalās arī paaugstinātas temperatūras patoģenēzē, stimulējot hipotalāma termoregulatoros mehānismus (Stephenson, 2013).

PGF_{2α} izraisa noteiktu gludo muskuļu kontrakcijas un bronhostrikciju (Galvão *et al.*, 2018). Prostaciklīns (PGI₂) ir visnozīmīgākais prostanoīds kardiovaskulārās homeostāzes nodrošināšanai, pateicoties spēcīgam vazodilatācijas efektam. Papildus PGI₂ kavē arī trombocītu agregāciju (Dorris and Peebles Jr, 2012). TXA₂ veidojas trombocītos un veicina vazokonstrikciju un trombocītu agregāciju, attiecīgi veicinot trombozi (Kumar *et al.*, 2017).

Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi darbojas kā neselektīvi COX enzīmu inhibitori, tos plaši izmanto gan īslaicīgu sāpju ārstēšanai, gan hronisku iekaisuma slimību, kā reimatoīdais artrīts un osteoartrīts terapijā. Taču NPL saista arī ar virkni blakusparādību kā gastrointestinālā trakta asiņošana, nieru mazspēja un kardiovaskulāras problēmas (Jaismy *et al.*, 2018). Tādēļ meklēja un sintezēja selektīvus COX-2 inhibitorus sauktus arī par koksibiem ar mērķi samazināt tradicionālo NPL blakusparādību risku, it īpaši kuņģa – zarnu trakta asiņošanu. Lai gan koksibi ievērojami uzlaboja gastrointestinālā trakta toleranci, hroniska lietošana palielināja kardiovaskulāro risku, pateicoties disbalansam starp COX-1 producēto TXA₂ un COX-2 atkarīgo PGI₂. Tādēļ daļa koksību tika atsaukti no tirgus, un rezultātā šobrīd Eiropā pieejami tikai divi: celekoksibs un etorikoksibs (Jaismy *et al.*, 2018; Sala *et al.*, 2018).

1.2.3. LOX ceļš

Lipoksigenāzes (LOX) ir enzīmu ģimene ar trīsvērtīgo (Fe₃₊) jeb nehēma dzelzi enzīma aktīvajā centrā, ko izmanto, lai katalizētu molekulārā skābekļa pievienošanu AS. Salīdzinot ar COX ceļu, kurā veidojas eikosanoīdi ar plašu bioloģiskās aktivitātes spektru, LOX ceļš ir vairāk mērķēts izsaukt bronhokonstrikciju un leukocītu migrāciju uz iekaisuma audiem (Hanna and Hafez, 2018). Atkarībā no oksigēnētā oglekļa atoma, izšķir 5-, 8-, 12-, 15- utt. LOX enzīmus, kas producē atbilstošas hidroperoksieikozatetrēnskābes (5-, 8-, 12-, 15-HPETE), bet tās ir nestabilas un kalpo kā prekursori attiecīgām hidroksieikozatetrēnskābēm (HETE), leukotriēniem un lipoksīniem (Powell and Rokach, 2015; Hanna and Hafez, 2018).

5-LOX katalizē AS oksidēšanu pie piektā oglekļa atoma, veidojot 5-HPETE, kam seko 5-HPETE pārvēršana starpproduktā: leukotriēnā (LT) A₄. Tālāk LTA₄ var metabolizēties par LTB₄, LTC₄, LTD₄ un LTE₄ (Weinberger *et al.*, 2015). Farmakoloģiskie līdzekļi, kas darbojas uz LOX ceļu, visbiežāk tiek izmantoti astmas ārstēšanā. Piemēram, zileutons darbojas kā 5-LOX inhibitors, bet leukotriēnu receptorus bloķē montelukasts.

LTB₄ lielākoties izdala neitrofili un makrofāgi kā hemotakses aģentu un neitrofilu aktivizatoru, lai veicinātu šūnu agregāciju un adhēziju, reaktīvo skābekļa sugu (ROS) un degradējošu enzīmu izdalīšanos no lizosomām (Kumar *et al.*, 2017).

LTC₄, LTD₄ un LTE₄ satur cisteīnu un tos sauc par cisteīna leukotriēniem (CysLT). Dēvē arī par anafilakses lēni reaģējošajiem savienojumiem (ang. val. *slow-reacting substance of anaphylaxis*), jo stimulē elpceļu gludās muskulatūras saraušanos (Buczynski *et al.*, 2009). Spēcīgās bronhokonstrikcijas dēļ, CysLT ir liela nozīme arī astmas patoģenēzē. Tos lielākoties veido tuklās šūnas, un savienojumi papildus bronhospazmai izraisa arī vazokonstrikciju un palielinātu vēnulu caurlaidību (Kumar *et al.*, 2017).

Lipoksīni (LX) atšķirībā no LT nomāc iekaisuma veidošanos, veicinot iekaisuma rezolūciju un audu homeostāzes atjaunošanos. LX signālceļi kavē neitrofilu adhēziju pie endotēlija šūnām un migrāciju hemotakses virzienā. To biosintēze atšķiras no citu lipīdu mediatoru veidošanās, jo nepieciešamas divas šūnu populācijas. Neitrofili caur 5-LOX ceļu veido un sekretē LTA₄, ko uzņem trombocīti un ar 12-LOX un 15-LOX enzīmiem pārvērš par LX (Buczynski *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2017).

1.2.3. CYP450 un izoprostona ceļš

Citohroma P450 (CYP450) enzīmi galvenokārt atrodas aknās un nodrošina ksenobiotiku metabolismu. CYP450 ceļš sastāv no 2 enzīmiem: epoksigenāzes un ω-hidroksilāzes.

Epoksigenāze, pievienojot skābekļa atomu vienam no oglekļiem pie AS dubultsaites, veido epoksieikozatrienoīnskābes (EET) (Buczynski *et al.*, 2009). Atkarībā no tā, kura dubultsaite ir oksidēta veidojas viens no izomēriem: 5,6-, 8,9-, 11,12-, vai 14,15-EET. Zināms, ka EET samazina leukocītu adhēziju, tomēr atsevišķu izomēru ietekme paliek neskaidra (Node *et al.*, 1999).

ω-hidroksilāze AS pārveido par HETE (Hanna and Hafez, 2018). No HETE izformām vairāk pētīta ir 20-HETE, kas veicina asinsvadu konstrikciju, savukārt citu izoformu aktivitāte ir pretēja, piemēram, 18- un 19-HETE darbojas kā vazodilatatori, inhibējot 20-HETE darbību (Buczynski *et al.*, 2009).

Vienīgo neenzimātisko AS metabolisma ceļu ierosina brīvie radikāļi, veidojot izoprostonus (IsoPS). Lai gan IsoPS ir AS kaskādes produkti, savienojumiem nav tiešas ietekmes uz iekaisuma reakcijām. IsoPS izmanto kā precīzus biomarkierus endogēnā oksidatīva stresa noteikšanai, jo tie ir tieši šūnu oksidācijas produkti (Milne *et al.*, 2011).

1.3. Ksantīna oksidāze

Nosaukumu ksantīna oksidoreduktāze (XOR) izmanto, lai apzīmētu divas stavstarpēji pārveidojamas viena enzīma formas: ksantīna dehidrogenāzi (XDH) un ksantīna oksidāzi (XO). Enzīms katalizē pēdējos divus soļus purīnu degradācijas ceļā. Sākumā hipoksantīnu oksidē par ksantīnu un tālāk ksantīnu par urīnskābi, bet kā blakusprodukti veidojas brīvie radikāļi. XDR ir intracelulārā XOR forma, bet ārpus šūnas vidē un cirkulācijā XO ir dominantā izoforma (Schmidt *et al.*, 2019). XO mājsaimnieciskās (ang.val. *housekeeping*) funkcijas papildus purīnu katabolismam iekļauj arī slāpekļa (II) oksīda (NO), vazodilatora, kas ir būtisks asinsvadu tonusam un endotēlija funkcijām, veidošanu (Battelli *et al.*, 2019).

Strukturāli enzīms ir homodimērs, un katra subvienība sastāv no četriem redokscentriem: viena molibdēna kofaktora, vienas flavīna adenīna dinukleotīda (FAD) saistīšanas vietas un diviem Fe₂S₂ klasteriem. XO katalizē hipoksantīna oksidāciju par ksantīnu un tālāk par urīnskābi molibdēna kofaktora centrā. Elektroni caur diviem dzelzs-sēra klasteriem nonāk FAD centrā, kur notiek NAD⁺ reducēšana par NADH. Savukārt elektronus no hipoksantīna un ksantīna oksidēšanas akceptē O₂ un veido ROS: superoksīda anjonu (O₂⁻) un ūdeņraža peroksīdu (H₂O₂). XO aktivitāte atkarīga no gēnu ekspresijas, ko kontrolē virkne faktoru kā hormoni, augšanas faktori un iekaisuma citokīni (Schmidt *et al.*, 2019).

Palielinātai XO aktivitātei var būt dažādas sekas atkarībā no reakcijas produktiem. Augsti ROS līmeņi izraisa oksidatīvo stresu, iekaisumu un mediē dažādus šūnu efektus, piemēram, citotoksicitāti un mutaģenēzi. Arī NO pārprodukcija veicina iekaisumu, oksidatīvo stresu un leukocītu aktivāciju. Urīnskābes uzkrāšanās var izraisīt hiperurikēmiju, kas ir pamatcēlonis podagrai, tādēļ XO inhibitori ir viens no potenciālajiem un vairāk pētītajiem mērķiem slimības ārstēšanā. Šobrīd vairāki XO inhibitori, kā allopurinols, feboksostats un topiroksostats tiek klīniski pielietoti podagras ārstēšanai. Tomēr ir gadījumi, kad šo zāļu ilgstoša lietošana ir ierobežota dzīvībai bīstamu blakusparādību dēļ, kā nieru mazspēja, Stīvena–Džonsona sindroms un fluminants hepatīts. Attiecīgi ir zināms pieprasījums pēc jauniem XO inhibitoriem, kas būtu gan efektīvi, gan ar mazāk blakusparādībām, lai ārstētu ne tikai podagra, bet arī virkni citu slimību, kurās iekaisumam un oksidatīvajam stresam ir liela nozīme slimības patofizioloģijā (Zhao *et al.*, 2020). Uzskata, ka hiperurīnēmija veicina

hipertensiju, aptaukošanos, insulīna rezistenci un citus faktorus metaboliskā sindroma patoģenēzē (Battelli *et al.*, 2019).

In vitro pētījumos flavonoīdi uzrāda XO aktivitātes inhibīciju. Novērots, ka flavonoīdiem ar hidroksilgrupu pie C-7 atoma ir spēcīgāka darbība par flavonoīdiem bez hidroksilgrupas, turklāt C-2/C-3 dubultsaites zudums B gredzenā ievērojami samazina aktivitāti (Nguyen *et al.*, 2006). 2020.gadā publicētā pētījumā (Zhao *et al.*, 2020) tika aprakstītas struktūras-aktivitātes attiecības starp flavonoīdiem un XO. Daļa no flavonoīdiem uzrādīja būtisku XO aktivitātes inhibīciju, tālāk, analizējot savienojumu struktūru, novēroja, ka efekts ir spēcīgāks, ja C4 un C5 pozīcijās pie B gredzena ir hidroksilgrupas. Taču hidroksilgrupas C3 un C5 pozīcijās ir nevēlamas, bez tam arī glikolizēšana pie C3 un C7 samazināja inhibīcijas efektu. Tādējādi no dažādu grupu un struktūru izmaiņām ir atkarīga flavonoīdu saistīšanās ar XO aktīvo centru, un no tās izrietoša samazināta vai palielināta inhibējošā aktivitāte (Zhao *et al.*, 2020).

1.4. Polifenoli

Ogu sulas pārstrādes izspiedas satur lielu daudzumu bioloģiski aktīvu savienojumu – polifenolu (Laroze *et al.*, 2010). Polifenoli ir augu sekundārie metabolīti, kuri iesaistīti augu aizsargmehānismos, piemēram, pret patogēniem un ultravioleto starojumu. Epidemioloģiskie pētījumi norāda uz polifenoliem bagāta uztura labvēlīgo ietekmi uz cilvēka organismu un hronisku slimību profilaksi, tādēļ arvien padziļinātāk tiek pētītas polifenolu apakšklases un savienojumi.

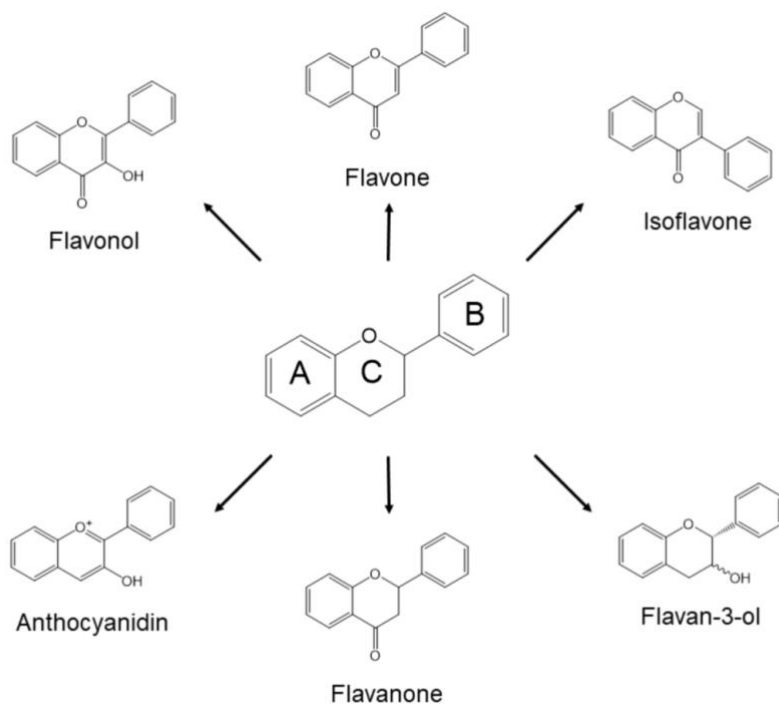
Augu valstī atklāti vairāk nekā 8000 fenolu savienojumu, un, pamatojoties uz fenola gredzenu skaitu un strukturāliem elementiem, kas tos saista kopā, tos klasificē četrās galvenajās klasēs: flavonoīdi, fenolskābes, stilbēni un lignāni (Yahfoufi *et al.*, 2018). Polifenoli plaši atrodami augļos, dārzeņos un arī dzērienos kā zaļā tēja, kafija un sarkanvīns (Pandey and Rizvi, 2009).

Polifenolu bioloģiskais efekts ir atkarīgs no uzņemtā daudzuma un biopieejamības, kas gan var stipri atšķirties. Pagaidām nav atrasta precīza saistība starp polifenolu daudzumu pārtikā un to biopieejamību cilvēka ķermenī, jo biopieejamību ietekmē virkne faktoru, turklāt tā savienojumiem atšķiras. Lielākoties polifenoli pārtikas produktos ir esteru, glikozīdu vai polimēru formā, taču šīs formas organismam nav iespējams absorbēt, tādēļ polifenoli tiek iesaistīti virknē reakciju. Sākumā mikrobiota un enzīmi savienojumus hidrolizē. Jau absorbcijas laikā zarnu trakta šūnās notiek pirmās modifikācijas un konjugācijas reakcijas, kam vēl seko metilēšana, sulfonizēšana un/vai glikuronizācija aknās. Absorbciju ietekmē arī

virikne citu faktoru – saistīšanās pie plazmas albumīniem, cilvēka individuālais mikrobiotas profils u.c. Rezultātā polifenolu metabolīti, kas sasniedz asinsriti un audus, atšķiras no sākotnējām polifenolu molekulām pārtikā, kā arī ne vienmēr visbiežāk diētā sastopamajiem polifenoliem ir vislabākā biopieejamība. Sarežģīta un atšķirīga polifenolu biopieejamība ir nozīmīgs aspekts, lai pētītu to bioloģisko aktivitāti un izstrādātu kvalitatīvus uztura un farmakoloģiskus līdzekļus slimību profilaksei un ārstēšanai (Pandey and Rizvi, 2009).

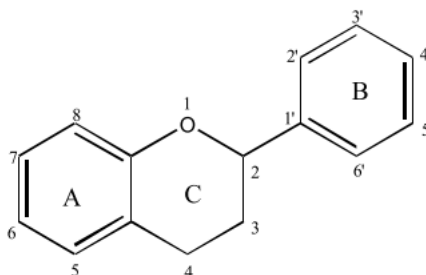
1.4.1. Flavonoīdu pretiekaisuma īpašības

Flavonoīdi ir viena no lielākajām un plašāk pētītajām polifenolu apakšklasēm un atrodami daudzos pārtikas produktos, kā augļos, dārzeņos, sojas pupiņās, kakao, riekstos, vīnā un olīveļļā (Joseph *et al.*, 2014). Flavonoīdiem bagātu uzturu saista ar zemāku hronisku slimību attīstības risku, tostarp hipertensijas, 2. tipa diabēta, vēža un ar samazinātu kardiovaskulāro slimību mirstību vīriešiem un sievietēm (McCullough *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2014). Flavonoīdi atkarībā no to struktūras (skat. 1.2.att) tiek iedalīti antocianīnu, flavonolu, flavonu, flavan-3-olu, flavanonu un izoflavonu klasēs (Pandey and Rizvi, 2009).



1.2. att. Flavonoīdu apakšklašu ķīmiskās struktūras (Kawabata *et al.*, 2019)

Biosintēze augos notiek no aromātiskajām aminoskābēm (fenilalanīna un tirozīna) un malonāta. Visu flavonoīdu pamatstruktūrā ir flavāna kodols (skat. 1.3. att.), kas sastāv no 15 oglekļa atomiem, kas savienoti trīs gredzenos (C₆-C₃-C₆). Gredzenus parasti apzīmē kā A, B un C. Flavonoīdu apakšklases atšķiras no oksidācijas līmeņa un C gredzena izmaiņām, savukārt, apakšklases robežās atšķirības parasti ir dažādas izmaiņas A un B gredzenos. No *Vaccinium* ģints izolēti vairāk nekā 116 flavonoīdu savienojumu, kuru struktūras atšķiras ar hidroksilgrupas aizvietotājiem B gredzenā un ar molekulai pievienotajiem cukuriem un to skaitu. Visbiežāk cukuri D-glikoze, L-amnoze, D-galaktoze, L-arabinoze un D-ksiloze ir saistīti ar O-glikozīdisko saiti pie gredzena C-3 vai C-7 pozīcijā (Su, 2012).



1.3. att. Flavāna kodols – flavonoīdu pamatstruktūra (Su, 2012)

Apjomīgi pētītas flavonoīdu antioksidatīvās īpašības, taču savienojumu bioloģiskā aktivitāte ir daudz plašāka. Noteiktas apakšklases uzrādījušas potenciālu aizsardzībā pret vēzi, kardiovaskulārām un nervu sistēmas slimībām, piemēram, epilepsiju un depresiju, kā arī pret citiem patoloģiskiem stāvokļiem.

Pēdējo gadu laikā parādās arvien jauni molekulāra līmeņi pētījumi par flavonoīdu ietekmi ne tikai uz iekaisumu un imūno atbildi, bet arī uz iekaisuma mediētām hroniskām saslimšanām (Pérez-Cano and Castell, 2016). 2019.gadā publicētā rakstā Maleki un kolēģi apkopojusi jaunākos zinātniskos pētījumus par flavonoīdu, visizplatītāko polifenolu uzturā, ietekmi uz iekaisumu (1.1. tabula).

Flavonoīdu pretiekaisuma īpašības un darbības mehānismi (Maleki *et al.*, 2019)

Flavonoīdu īpašības	Mehānisms	Sekas
Regulatīvo enzīmu inhibīcija	Proteīnkināžu un fosfodiesterāžu inhibīcija	Samazināta signālu pārraide, samazināta šūnu aktivizācija
Gēnu ekspresijas modulācija	Transkripcijas faktoru modulācija, piemēram, NF- κ B	Samazināta iekaisumu veicinošo gēnu transkripcija
Ietekme uz AA metabolismu	PLA ₂ , COX, LOX inhibīcija	Samazināta iekaisumu veicinošo PG, LT, TXA ₂ un citu mediatoru atbrīvošana
Iekaisuma šūnu modulācija	Inhibīcija uz šūnu: <ul style="list-style-type: none"> • Aktivizēšanu • Nobriešanu jeb maturāciju • Signālu pārnesei • Sekretorajiem procesiem 	Nenobriedušas šūnas, samazināta proliferācija, samazināta iekaisumu veicinošo citokīnu izdalīšanās
Antioksidatīvas īpašības	Kavē brīvo radikāļu ražošanu, “savācēji” (ang. val. <i>scavenger activity</i>)	Samazināts oksidatīvais stress

Pirmkārt, dažādi flavonoīdi spēj inhibēt virkni proteīnkināžu kā fosfoinozitola kināzi, proteīnkināzi C un ciklīn-atkarīgo kināzi-4. Proteīnkināzes ir atbildīgas par signāla pārraidi iekaisuma procesos, tāpēc to inhibīcija aptur tālākus signālus un iekaisuma procesu. Tās var inhibēt arī caur gēnu transkripcijas inhibīciju (Maleki *et al.*, 2019). Piemēram, kodola transkripcijas faktors κ B (NF- κ B) ir komplekss proteīns, kuru aktivē iekaisuma citokīni, un tas no citoplazmas tiek pārvietots uz šūnas kodolu, lai kontrolētu iekaisumu veicinošo gēnu ekspresiju, tostarp COX-2, citokīnu (IL-1, IL-2, IL-6, un TNF α), hemokīnu, inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes (iNOS) un adhēzijas molekulu (Yahfoufi *et al.*, 2018; Maleki *et al.*, 2019). Tādēļ NF- κ B aktivīcijai ir nozīmīga loma procesā, un veidojas “cilpa” - iekaisuma atbilde turpina pastiprināties, jo ekspresēto gēnu mediatori izdala vēl vairāk mediatoru, kas, savukārt, tālāk iedarbojas uz citiem iekaisuma komponentiem un atkal stimulē arī NF- κ B aktivitāti (Y. S. Kim *et al.*, 2009).

Flavonoīdi inhibē arī fosfodiesterāzes, piemēram, cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMF) fosfodiesterāzi. cAMF ir sekundārais mesendžers, kas regulē virkni šūnu procesu iekaisuma laikā. Paaugstinātu cAMF līmeni saista ar pretiekaisuma funkcijām, un flavonoīdu izraisīta fosfodiesterāzes inhibīcija bloķē cAMF degradāciju, paildzinot cAMF signālceļu signālus.

Flavonoīdi pazīstami kā spēcīgi antioksidanti, jo spēj "savākt" reaktīvās skābekļa sugas (ROS), reaktīvās slāpekļa sugas un citas reaktīvās daļiņas, kā arī kavēt jaunu brīvo radikāļu veidošanos (Maleki *et al.*, 2019). Palielinātu ROS līmeni saista ar oksidatīvo stresu un proteīnu oksidāciju, kas aizsāk dažādu iekaisuma molekulu un signālu kaskādes (Yahfoufi *et al.*, 2018). Bez tam iekaisumā iesaistītās šūnas uzņem skābekli un arī izdala ROS, un sekretējot dažādus mediatorus, piesaistā vēl iekaisumu šūnu, kas bojājuma vietā izdala vēl vairāk ROS. Rezultātā tiek aktivizēti transkripcijas faktori un iekaisuma gēni, un turpina palielināties mediatoru skaits. Šis nebeidzamais cikls veicina hronisku slimību attīstību oksidatīvā stresa un iekaisuma procesu mijiedarbībā (Joseph *et al.*, 2014). Tāpēc arī antioksidatīvās spējas ir cieši saistītas ar flavonoīdu pretiekaisuma efektu.

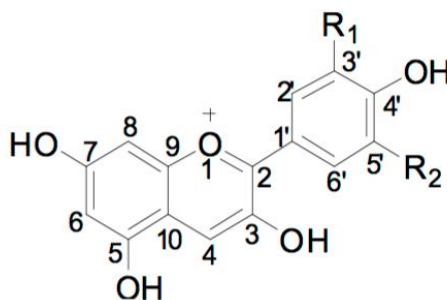
Novērots, ka flavonoīdiem ir potenciāls inhibēt iekaisumu veicinošos enzīmus: PLA₂, COX un LOX (Maleki *et al.*, 2019). Hanáková *et al.* (2017) veiktā pētījumā flavoni inhibēja COX-1, COX-2 un 5-LOX enzīmu aktivitāti, flavonu aktivitāti apstiprināja arī ar dokinga pētījumiem enzīmu aktīvajā centrā (Hanáková *et al.*, 2017). Citā dokinga pētījumā (Megantara *et al.*, 2018) kvercitrīns (-8,6 kcal/mol) atzīts par potenciālu COX-2 enzīma aktivitātes inhibitoru, lai gan tā inhibīcija ir mazāka par selektīva COX-2 inhibitora celekoksiba (-10,00kcal/mol) aktivitāti (Megantara *et al.*, 2018).

Flavonoīdus saista arī ar tiešām specifisku imūno šūnu skaita un diferenciācijas izmaiņām, ko flavonoīdi realizē, inhibējot aktivizāciju, nobriešanu, signālu pārneši utt. Pierādīts, ka flavonoīdi inhibē dendrītisko šūnu nobriešanu, nomācot marķierus CD80, CD86, kas ir būtiskas molekulas CD4H⁺ T šūnu aktivācijai. Rezultātā ir inhibējošs efekts uz CD4H⁺ T šūnu proliferāciju un citokīnu sekrēciju. Vairāki pētījumi norāda, ka flavonoīdi var samazināt histamīna un prostaglandīnu izdalīšanos no tuklajām šūnām un inhibēt iekaisumu veicinošo citokīnu un hemokīnu izdalīšanos no neitrofiliem, tuklajām šūnām un citām imūnajām šūnām. Vēl viens pretiekaisuma mehānisms ir šūnu signālu pārnesei inhibīcija. Flavonoīdi var tieši bloķēt receptorus, piemēram, saistoties ar IL-17 subvienību, tādējādi vājinot IL-17 signāla pārneši, vai bloķēt receptoru lejupstraumes signālceļus (*downstream signaling*), kā, piemēram, ja imūnglobulīns E varētu saistīties ar receptoru, taču nenotiktu tālāki molekulāri procesi šūnas iekšienē. Līdzīgi flavonoīdi var darboties arī uz citu receptoru lejupejošiem signālceļiem (*downstream signaling*) iekaisuma vietā (Maleki *et al.*, 2019).

1.4.2. Antocianīnu pretiekaisuma īpašības

Antocianidīni ir viena no flavonoīdu apakšklasēm ar skābekļa atomu C gredzenā, kas nes pozitīvu lādiņu, un padara molekulu īpaši reaģētspējīgu. Augos antocianidīni parasti ir esterificēti kopā ar vienu vai vairākiem cukuriem, un tos sauc par antociānīniem (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Galaktoze, glikoze, arabinoze, ksiloze un ramnoze ir biežākie saistītie cukuri mono-, di- vai tri-saharīda formā caur C-3 hidroksilgrupu C gredzenā (Su, 2012).

Antociānīni pazīstami kā ūdenī šķīstoši pigmenti, kas atbild par daudzu augļu, dārzeņu un ziedu zilo, sarkano un violeto krāsu. Galvenie antociānīnu ieguves avoti ir tumšās ogas kā mellenes, kazenes, dzērvenes, upenes, avenes, sarkanās vīnogas, un dārzeņi kā sarkanie kāposti un redīsi, arī daļa riekstu un sarkanvīns (Rózańska and Regulska-Ilow, 2018). Tos uzskata par vienu no svarīgākajām polifenolu apakšklasēm, kas veido būtisku daļu no kopējā ogu polifenolu satura (Joseph *et al.*, 2014).



Nosaukums	R ₁	R ₂
Delfinidīns	OH	OH
Petunidīns	OCH ₃	H
Cianidīns	OH	H
Pelargonidīns	H	H
Peonidīns	OCH ₃	H
Malvidīns	OCH ₃	OCH ₃

1.4. att. Antociānīdu ķīmiskā struktūra. Attēls ar izmaiņām no (Su, 2012).

Augos atrasti vairāk kā 600 antociānīni, no kuriem ogās visbiežāk sastopamie antociānīni (skat. 1.4.att.) ir cianidīns, delfinidīns, pelargonidīns, peonidīns, malvidīns un petunidīns (Vendrame and Klimis-Zacas, 2015). Līdz šim 35 dažādas šo antociānīnu glikozīdiskas formas izolētas un identificētas melleņu ģints augos (Su, 2012). Antociānīni un antociānīdīni kopumā ietekmē vairāk nekā 120 receptoru aktivitāti, iekš- un ārpus- šūnu

signālmolekulas, transkripcijas faktorus un gēnu ekspresiju (Domitrovic, 2011). Tādēļ tiem piemīt plašs farmakoloģiskās darbības spektrs, kā antidiabētiska, pretaptaukošanās, pretiekaisuma un antimikrobiāla darbība. Pastāv korelācija starp antociānīniem bagātu uzturu un zemāku kardiovaskulāro slimību biežumu (Manolescu *et al.*, 2019). *In vitro* un dzīvnieku modeļi pierādījuši, ka ogu antociānīniem ir preventīvas un vēzi nomācošas īpašības, pateicoties antioksidantu, antiproliferatīvai, apoptotiskai un pretiekaisuma darbībai, taču devas, kas dod šādu efektu, ir daudz lielākas par devām, ko var uzņemt ar antociānīniem bagātu diētu (Chu *et al.*, 2011).

Fallah *et al.* (2020) sistemātiskais pārskats apstiprina, ka ar antociānīniem bagāts uzturs, it īpaši devās lielākās par 300mg/dienā, ievērojami samazina iekaisuma mediatoru, C reaktīvā proteīna (CRP), IL-6, audzēja nekrozes faktora alfa (TNF- α), vaskulārās šūnu adhēzijas molekulas - 1 (VCAM-1) un intracelulārās adhēzijas molekulas -1 (ICAM-1) plazmas līmeņus (Fallah *et al.*, 2020). Iekaisuma mediatoru līmeņu samazināšanos varētu skaidrot ar antociānīnu spēju inhibēt NF- κ B signālceļu, jo tā kaskāde izraisa iekaisuma mediatoru ekspresiju, COX-2, iNOS, IL-1, IL-6 un TNF- α , adhēzijas un citu iekaisuma molekulu aktivāciju (Aboonabi *et al.*, 2020).

Antociānīni var darboties arī kā enzīmu inhibitori, piemēram, inhibēt FLA₂ aktivitāti, kas atbild par pirmo eikosanoīdu biosintēzes soli no arahidonskābes (Dreiseitel *et al.*, 2009). Piemīt arī spēja inhibēt COX-1 un COX-2 enzīmu aktivitāti atkarībā no brīvo hidroksilgrupu daudzuma molekulā, piemēram, cianidīnam novērots lielāks inhibitora potenciāls (Domitrovic, 2011). Antociānīni palielina endoteliālās slāpekļa oksīda sintāzes (eNOS) aktivitāti, kas sintezē bioloģiskajiem procesiem svarīgo slāpekļa (II) oksīdu (NO) (Edirisinghe *et al.*, 2011). Savukārt, iNOS, kas no trīs NOS sintāzēm visvairāk saistīta ar iekaisumu, ekspresiju samazina un inhibē enzīma aktivitāti, tādējādi limitējot NO pārprodukcijas radītu iekaisumu veicinošu efektu.

Vēl viens ar iekaisumu saistīts signālceļš, kuru spēj inhibēt antociānīni, ir mitogēna aktivētas proteīnkināzes (MAPK) (Vendrame and Klimis-Zacas, 2015). Tas ir būtisks mehānisms, jo MAPK ir proteīnkināžu ģimene, kas regulē fundamentālus šūnu procesus kā diferenciācija, mitoze un apoptoze. Kināzes regulē iekaisumā iesaistītos transkripcijas faktorus un gēnus (Shi *et al.*, 2017).

Kopumā antociānīniem piemītošās pretiekaisuma īpašības saistāmas ar samazinātu iekaisuma mediatoru koncentrāciju, iNOS aktivitātes regulāciju un COX-2 aktivitāti. Lielākā daļa pētījumu norāda uz NF- κ B ceļu kā galveno antociānīnu pretiekaisuma darbības mehānismu. Gan *in vitro*, gan *in vivo* pētījumi pierāda, ka antociānīni bloķē NF- κ B translokāciju un aktivāciju, kā arī tā inhibitora fosforilēšanu. Turklāt NF- κ B ir jutīgs uz

redoksi reakcijām, tāpēc daļa efekta ir pateicoties antociānīnu spēcīgajai antioksidantu aktivitāte.

Nepieciešami tālāki pētījumi, lai uzlabotu šī brīža zināšanas par bioloģiski efektīvām antociānīnu devām, konkrētu antociānīnu un antociānīdīnu darbību (Vendrame and Klimis-Zacas, 2015).

1.5. Melleņu ģints (*Vaccinium spp.*)

Vaccinium spp. pieder ēriku dzimtai (*Ericaceae*) un ir morfoloģiski daudzveidīga ģints ar aptuveni 450 sugām, kas lielākoties atrodamas Ziemeļu puslodes vēsākajos platuma grādos, lai gan atklātas arī dažas tropiskas sugas Madagaskarā un Havaju salās. Ģintij pieder gan savvaļas sugas, gan ekonomiski nozīmīgas šķirnes (Karppinen *et al.*, 2016). Ķīmiski spēj sintezēt plašu spektru dažādu savienojumu kā flavonoīdus, antociānīnus, kumarīnus, lignānus, benzolskābes, iridoīdus, sterolus un triterpenoīdus. Īpaši svarīga ir flavonoīdu un antociānīnu biosintēze, un šobrīd jau vairāk nekā 116 dažādu antociānīnu un flavonoīdu izolēti no *Vaccinium* ģints augļiem un lapām (Su, 2012). Bez tam satur arī citus nozīmīgus savienojumus kā karotenoīdu atvasinājumus, fenilpropanoīdus un vitamīnus. Šīs fitoķīmiskās vielas ir pamats ģints plašajam bioloģiskajam spektram ar pretiekaisuma, pretptaukošanās, pretvēža, antimikrobiālām un citām īpašībām.

Liela nozīme sekundāro metabolītu biosintēzē ir vides apstākļiem, kas ietekmē to daudzumu un savienojumu kvalitāti. Lai gan *Vaccinium spp.* augi ir piemēroti augšanai un bioloģiski aktīvo vielu biosintēzei ēnainos biotopos, lielāks gaismas starojums saistāms ar augstāku kopēju polifenolu un antociānīnu daudzumu. Piemēram, mellenēs, kas audzētas saules gaismā, ir lielākas fenolsavienojumu koncentrācijas, salīdzinot ar ēnā augušām. Kā arī fenolsavienojumu un vitamīna C sintēzei labvēlīgākas ir zemākas gaisa temperatūras, taču tās variē atkarībā no sugas. Novērots, ka sarkanās krāsas *Vaccinium* ogās ir vairāk procianidīnu, bet mazāka antociānīnu daudzveidība (Karppinen *et al.*, 2016). Interesanti, ka lielākoties pētījumos tiek apskatīti augļi, taču izpētīts, ka *Vaccinium spp.* lapās un kātos ir vēl vairāk farmakoloģiski nozīmīgu fenolu nekā augļos (Bujor *et al.*, 2019).

1.5.1. Mellenes (*Vaccinium myrtillus L.*)

Mellenes (ang.val. *bilberry*) ir savvaļas augs, satopams pļavās, mitros skujkoku mežos un kalnos Eiropā un Ziemeļamerikā. To zilgani melnie augļi ir mazi (5-9mm diametrā) un satur daudz sēklu. Mellenēm ir augstāks antociānīnu saturs par virkni citu ogu, kā zemenēm,

ķiršiem un avenēm u.c. Totālais antocianīnu sastāvs svaigās mellenēs ir 300-700mg/100g un variē atšķirībā no augšanas apstākļiem un augļu gatavības. Papildus antocianīniem satur arī 3mg C vitamīna uz 100mg svaigu ogu (Chu *et al.*, 2011).

Mellenes pazīstamas ar virkni veselību uzlabojošām īpašībām: antioksidanti, mazina iekaisumu un oksidatīvo stresu, arī lipīdu un glikozes līmeņus asinīs. Pateicoties šīm īpašībām, plaši pētīta ietekme uz hroniskām saslimšanām, kā diabēts, aptaukošanās un ateroskleroze (Bujor *et al.*, 2016). Mellenēm ir potenciāls samazināt aptaukošanos un ar to saistītas slimības. Piemēram, kāmjējiem pēc 10 nedēļu ilgas barošanas ar augstu tauku un cukura diētu uzsāka ārstēšanu ar melleņu lapu ekstraktiem. Novēroja, ka 25 un 35 mg/kg dienas devas samazināja gan viscerālo tauku, gan kopējo ķermeņa masu, kā arī brīvo tauksskābju, triglicerīdu un kopējā holesterola līmeņus serumā (Zagayko *et al.*, 2018). Mellenes vēsturiski izmanto redzes uzlabošanai un dažādu acu traucējumu ārstēšanai. Novērots arī tiešs antimikrobiāls efekts uz cilvēka patogēniem, tostarp *Salmonella* un *Staphylococcus aureus* (Chu *et al.*, 2011).

Melleņu labvēlīgo efektu uz veselību un daudzu saslimšanu profilaksi saista ar to pretiekaisuma īpašībām (Bujor *et al.*, 2016). Pētījumā ar augstu tauku saturu barotām pelēm melleņu pulvera lietošana samazināja sistēmisko iekaisumu un palielināja insulīna jutīguma biomarķierus, apstiprinot hipotēzi, ka melleņu antocianīniem piemītošās pretiekaisuma īpašības spēj novērst zarnu trakta disbiozi un attiecīgi samazināt ar aptaukošanos saistītu hronisku iekaisumu (Lee *et al.*, 2018).

Karlsen *et al.* (2010) novēroja samazinātas iekaisuma marķieru koncentrācijas pieaugušajiem ar palielinātu kardiovaskulāro slimību risku pēc tam, kad 4 nedēļas tika dzerti 300ml melleņu sulas dienā. Pētījuma ietvaros noteica arī melleņu polifenolu – kvercītīna, epikatehīna un resveratrola – spēju inhibēt lipopolisharīdu izraisītu NF-κB aktivāciju monocītu šūnu līnijā. Līdzīgi arī 400g svaigu ogu dienā pēc 8 nedēļu ilgas lietošanas samazināja iekaisuma marķieru - plazmas CRP, IL-6, un IL-12 – līmeņus, un kopējais iekaisuma rezultāts (ang.val. *inflammation score*) statistiski nozīmīgi atšķīrās ($p=0,024$) no kontroles grupas (Kolehmainen *et al.*, 2012).

1.5.2. Krūmmellenes (*Vaccinium corymbosum* L.)

Krūmmeleņu nosaukums angļu valodā ir *blueberry*, un tā ir visplašāk komerciāli kultivētā *Vaccinium spp.* suga (Lim, 2012). Arī kūmmellenēs ir augsts antocianidīnu, lielākoties glikolizēto formu, flavanolu, kā kvercītīns, kampferols un mircetīns, katehīnu, benzol- un kanēļskābju daudzums. Taču Itālijā veiktā pētījumā, salīdzinot savvaļas

(*V.myrtillus* L.) un kultivētās (*V.corymbosum* L.) mellenes, savvaļas ogām novēroja augstāku kopējo fenolu, antociānīnu un antioksidantu daudzumu un divreiz lielāku antioksidatīvo aktivitāti. Tiek uzskatīts, ka antioksidantu aktivitātei ir lielāka sakarība ar kopējo fenolsavienojumu daudzumu nekā antociānīnu koncentrāciju (Giovanelli and Buratti, 2009). Krūmmelleņu bioloģiskās darbības spektrs ir līdzīgs melleņu, pateicoties līdzīgam fitoķīmisko vielu sastāvam.

Figueira un kolēģi viena pētījuma ietvaros (2016) analizēja krūmmelleņu ekstrakta ķīmisko sastāvu, antioksidatīvo potenciālu un pretiekaisuma efektu divos dzīvnieku modeļos ar akūtu un hronisku iekaisumu. Vienreizēja krūmmelleņu ekstrakta deva pirms karagināna lokālas injekcijas žurku ķepā par 30% samazināja ķepas tūsku, savukārt medikamenti (trolekss - E vitamīna ūdenī šķīstošs analogs; tempols (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidīn-1-oksil) – SOD mimētiķis; indometacīns – neselektīvs COX inhibitors) ar dažādiem pretiekaisuma darbības mehānismiem par 50%. Reimatoīda atrīta modelī žurkas 13 dienas ārstēja ar melleņu ekstraktu (12mg/kg dienā) un novēroja 70% mazāku tūsku par neārstēto reimatoīda atrīta grupu, norādot uz orālu uzņemtu melleņu pretiekaisuma darbību hroniska iekaisuma gadījumā. Ārstēšana nomāca ne tikai vizuāli redzamo tūsku, bet arī uzlaboja klīniskos parametrus: histoloģiskos un radiogrāfijas rādītājus. Ar ekstraktu ārstētajām žurkām bija ievērojami mazāka COX-2 un iNOS ekspresija un citokīnu (TNF- α , IL-1 β un IL-6) seruma līmeņi, apstiprinot zīmīgu iekaisuma singāļceļu nomākumu (Figueira *et al.*, 2016).

Astoņas nedēļas pelēm ar augstu tauku satura diētu papildus deva melleņu pulveri, lai noskaidrotu, vai tas ietekmēs taukaudu iekaisumu un insulīna rezistenci. Salīdzinot iekaisuma marķierus pelēm, kas uzņēma melleņu pulveri, ar kontroles grupu, novēroja, ka mellenes samazināja vai pilnībā novērsa iekaisuma gēnu ekspresiju un oksidatīvo stresu, kā arī pasargāja no hiperglikēmijas, insulīna rezistences un samazināja adipocītu nāvi (DeFuria *et al.*, 2009).

Makrofāgi ir būtisks iekaisuma komponents, jo izdala virkni citokīnu un veicina imūno atbildi. Molekulāro mehānismu pētījumi atklājuši, ka makrofāgu poliferācija un attīstība saistīta ar NF- κ B signālceļu. Melleņu lapu flavonoīdi makrofāgu šūnu līnijās statistiski nozīmīgi samazināja TNF- α koncentrācijas un arī NF- κ B subvienības p65 līmeņus. Rezulāti norāda, ka melleņu lapu flavonoīdu pretiekaisuma īpašības daļēji var izskaidrot ar NF- κ B signālceļu saistītu gēnu transkripcijas inhibīciju (Shi *et al.*, 2017).

1.5.3. Lielogu dzērvenes (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) un purva dzērvenes (*Vaccinium oxycoccos* L.)

Lielogu dzērvene (*V. macrocarpon* Ait.) zinātniskajos rakstos atrodama arī ar nosaukumu amerikāņu dzērvene (ang.val. *American cranberry* Ait.). Tas ir zems, daudzgadīgs un mūžzaļš krūms ar sfēriskām ogām. Plaši tiek kultivētas kā alternatīva savvaļā augošajai purva dzērvenei (*V.oxycoccus* L.), kurai raksturīgāki mazāki augļi (Narwojsz *et al.*, 2019). Purva dzērveni angļiski dēvē arī par Eiropas dzērveni un, salīdzinot ar lielogu dzērveni, tās ģeogrāfiskā izplatība ir ievērojami lielāka, tomēr tā ir daudz mazāk pētīta. Sastopama Eiropas, Āzijas un Ziemeļamerikas purvos un mežos.

Dzērveņu augļi nogatavojas visu septembri, sākot ar augusta beigām, un var būt rozā, sarkani vai tumši sarkani ar izteikti skābu garšu (Jurikova *et al.*, 2019). Atklāts, ka sarkanākās ogās (savvaļas) palielinās antociānīnu sastāvs, taču ir mazāk citu fenolsavienojumu, tāpēc šādām ogām ir zemāka antioksidantu aktivitāte. Abās dzērveņu sugās peonidīna-3-galaktozīds ir dominantais antociānīns un, papildus virknei flavonoīdu, augļi satur arī A, C un E vitamīnu (Narwojsz *et al.*, 2019). Noskaidrots, ka kultivētās dzērvenēs ir augstāka C vitamīna koncentrācija par savvaļas ogām (Dorofejeva *et al.*, 2011). Dzērveņu izspiedu etanola ekstraktā novērots 3-4 reizes lielāks fenolskābju un antioksidantu daudzums nekā sulā, bet flavonolu un antociānīnu daudzums attiecīgi 5 un 6 reizes vairāk (Das *et al.*, 2019).

Dažāda veida dzērveņu produkti (sulas, pulveri, tabletes un kapsulas) tiek izmantoti, lai novērstu un ārstētu urīnceļu infekcijas. Domājams, ka darbības pamatā ir proantociānīnu spēja bloķēt baktēriju adhēziju pie urīnceļu šūnām (Popov *et al.*, 2006). Šī paša efekta dēļ tiek uzskatīts, ka dzērvenes var arī izmantot, lai novērstu *H.pylori* adhēziju pie kuģa epitēlija šūnām (Skrovankova *et al.*, 2015). Dzērvenes ne tikai novērš patogēno baktēriju adhēziju, bet arī veicina labvēlīgo baktēriju celmu skaita pieaugumu zarnu mikroflorā (Anhê *et al.*, 2015). Lielogu dzērveņu izspiedu ekstrakta antibakteriālo efektu pētīja uz bieža pārtikas kontaminanta un gastroenterīta izraisītāja *Salmonella enterica* augšanu. Izspiedu 4mg/ml ekstrakts ietekmēja 57 gēnu ekspresiju, bet 8mg/ml uzrādīja minimālo šīs salmonellas inhibīcijas koncentrāciju (Das *et al.*, 2019).

Lielogu dzērveņu ekstraktam piemīt arī antifungāla darbība (Ermis *et al.*, 2015). Novērots tā potenciāls kardiovaskulāru slimību profilaksē un ārstēšanā, un aizsardzībā pret lipīdu peroksidāciju (Skrovankova *et al.*, 2015).

Saistībā ar iekaisuma procesu atklāts, ka no *V. oxycoccos* dzērvenēm iegūtais pektīns uzrāda pretiekaisuma īpašības un profilaktisku iedarbību uz etiķskābes izraisītu kolītu pelēm (Popov *et al.*, 2006). Kim *et al.* (2011) pētījumā izmantoja ar augsta tauku saturu barotas

žurkas, un iekaisumu izraisīja ar baktēriju lipopolisaharīdiem (ang. val. *LPS-treated*). Žurkas 6 nedēļas baroja ar liofilizētu dzērveņu pulveri. Serumā novēroja samazinātu iekaisuma veicinošo citokīnu - CRP, IL-1 β un IL-6 – līmeni, kā arī palielinātu pretiekaisuma citokīna IL-10 koncentrāciju (Kim *et al.*, 2011). Dzērveņu pretiekaisuma īpašības pētītas arī uz ar augstu tauku saturošas diētas nobarotu (ang.val. *high-fat-fed obese*) peļu aknu iekaisumu. Pēc 10 nedēļām novēroja par 69% samazinātus aknu *tool-like* receptora 4 (TLR4) mRNS līmeņus un par 30% NF- κ B, kas ir būtiski, jo saistīšanās ar TLR4 receptoru aktivizē iekaisuma kaskādi, kurā NF- κ B nodrošina iekaisumu veicinošo mediatoru transkripciju. TLR4/ NF- κ B ass un no tās izrietošo iekaisuma biomarķieru samazināšanās norāda uz dzērveņu potenciālu vājināt iekaisumu, kas saistīts ar steatozes progresēšanu steatohepatītā (Glisan *et al.*, 2016).

1.5.4. Brūklenes (*Vaccinium vitis-idaea* L.)

Brūklenes plaši sastopamas Eirāzijas sausajos priežu mežos un purvos. Sīkkrūmains augs ar aptuveni vienu 1 cm diametrā lielu, sarkanu augli, kas nogatavojas jūlija beigās, augustā (Latvijas Daba). Svarīgākie fenolu savienojumi ir proantocianidīni, sastādot aptuveni 63-71% no kopējā fenolu daudzuma, bet atrasti arī antocianīni, hidroksi-kanēļskābe, hidroksibezolskābe un flavanoli (Kylli *et al.*, 2011).

Šūnu pētījumi norāda uz brūkleņu neiroprotektīvajiem, pretiekaisuma efektiem un sirds un asinsvadu sistēmas aizsardzību (Bujor *et al.*, 2018). Ilgstoša brūkleņu sulas lietošana pat zemās koncentrācijās samazina sistolisko asinsspiedienu un uzlabo endotēlija atkarīgo vazodilatāciju hipertensīvām žurkām (Kivimäki *et al.*, 2013). Polifenoliem bagāts brūkleņu ekstrakts uzrāda antiproliferatīvu efektu uz cilvēka dzemdes kakla un resnās zarnas vēža šūnām. Tā paša pētījuma ietvaros, lai precīzāk noskaidrotu, kuri savienojumi izraisa efektu, veica brūkleņu ekstraktu fracionēšanu. Tanīniem bagātā frakcija saglabāja savu antiproliferatīvo efektu, savukārt, antocianīnu frakcijai novēroja ievērojami mazāku efektivitāti par oriģinālo ekstraktu (McDougall *et al.*, 2008). No brūklenēm izolētie flavonoīdi *in vitro* uzrāda antimikrobiālu darbību uz mutes dobuma patogēniem, kas saistīti ar kariesu un periodontītu (Riihinen *et al.*, 2014). Brūkleņu proantocianidīnu ekstraktam ir spēcīga antimikrobiāla darbība pret *Stahylococcus aureus*, taču nav efekta uz tādiem baktēriju celmiem kā *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* un *Lactobacillus rhamnosus*. Klīniskajos pētījumos novērota pret gingivīta un kariesa darbība, liecinot par iespējamu flavonoīdiem bagātu ēdienu un dzērienu ietekmi uz mutes dobuma veselību (Riihinen *et al.*, 2014).

Brūkleņu pretiekaisuma īpašības pierādītas vairākos pētījumos. Brūkleņu fenolu ekstrakts ar koncentrāciju 100 μ g/ml inhibē IL-6 un TNF- α (Kylli *et al.*, 2011). Astoņas

nedēļas ilgā pētījumā brūkleņu un arī purva dzēveņu sulas tika dotas spontāni hipertensīvām žurkām. Pētnieku grupa novēroja samazinātas mRNA ekspresijas COX-2, monocītu hemoatraktanta proteīnam 1 (MCP-1), angiotenzīna konvertējošā enzīmam 1 (ACE1) un P-selektīnam (Kivimäki *et al.*, 2012). Vēl vienā Kivimäki vadītā pētījumā brūkleņu sula mēreni ietekmēja augsta sāls daudzuma izraisītu zemas pakāpes iekaisumu žurkām (Kivimäki *et al.*, 2014).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Reaģenti, materiāli un palīgvielas

Sausie melleņu, krūmmelleņu, lieloģu dzērveņu, purva dzērveņu un brūkleņu izspiedu ekstrakti saņemti no LU Ģeogrāfijas un Zemes zinātņu fakultātes Vides zinātnes nodaļas

Metanols no *Sigma-Aldrich* (ASV)

Fosfāta buferēts šķīdums (PBS buferšķīdums) no *Sigma-Adlrich* (ASV)

Destilēts un dejonizēts ūdens

Arahidonskābe no *Sigma-Aldrich* (ASV)

Nātrija hidroksīds no *Sigma-Aldrich* (ASV)

Ksantīns no *Sigma-Aldrich* (ASV)

Ksantīna oksidāze no *Sigma-Aldrich* (ASV)

Baltās un melnās 96-lauciņu mikroplates no *Greiner, Merck* (ASV)

Mikropipetes (10-100; 20-200; 1000 µL) no *Eppendorf International* (Vācija)

Multi-kanālu pipete no *Eppendorf International* (Vācija)

Pipešu uzgaļi no *Sarstedt* (Vācija)

Eppendorf mēģenes 1,5ml un 50ml no *Sarstedt* (Vācija)

Eppendorf mēģenu statīvi no *Sarstedt* (Vācija)

COX-1 inhibitoru skrīninga komplekts # K548-100 no *BioVision* (ASV), kurā ietilpst:

- 25 ml COX metodes buferšķīdums
- 200 µl COX Probe (šķīdināts DMSO),
- 20 µl COX Cofactor (šķīdināts DMSO),
- 50 µl arahidonskābe
- 500 µl nātrija hidroksīds
- 1 flakons ar liellopa COX-1 enzīmu
- 100 µM SC560 (šķīdināts DMSO)

5-LOX inhibitoru skrīninga komplekts # K980-100 no *BioVision* (ASV), kurā ietilpst:

- 25 ml LOX metodes buferšķīdums
- 200 µl LOX Probe
- 6 µL LOX substrāts
- 100 µl Zileutons
- 200 µl 5-LOX enzīms

No *Cayman Chemical* reaģentu komplekta ksantīna oksidāzes fluorometriskai noteikšanai izmantots tikai XO metodes buferšķīdums, XO detektors ADHP (10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazīns) un mārrotku peroksidāze. Komplekts Nr. 10010895 no *Cayman Chemical* (ASV).

2.1.2. Aparatūra

Analītiskie svāri Precisa XB 120A, SERIES 320 XB D99 – D9 – 030 no *Precisa* (Šveice)

Vortex maisītājs no *Biosan* (Latvija)

Centrifūga Microspin FV2400 no *Biosan* (Latvija)

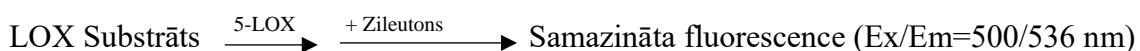
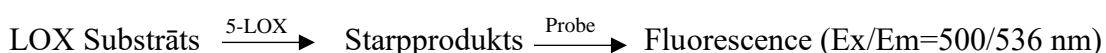
Mikroplašu lasītājs TEKAN Infinite 200 PRO no *Tecan Group Ltd* (Šveice)

Dators, savienots ar mikroplašu lasītāju

2.2. Metodes

2.2.1. 5-LOX inhibitoru skrīnings

Potenciālo 5-lipoksigenāzes inhibitoru skrīninga pamatā ir enzīma veidotā starpprodukta fluorescence pie 500nm ierosinājuma un 536 nm emisijas viļņiem (Ex/Em=500/536 nm). Kā pozitīvā kontrole tiek izmantots zileutons, plaši pielietots 5-lipoksigenāzes inhibitors.



5-LOX skrīninga komplektu uzglabā -20 °C, sargājot no gaismas. Eksperimenta laikā visus reaģentus ieteicams turēt ledū, izņemot LOX metodes buferšķīdumu, kas pirms lietošanas jāatsilda līdz istabas temperatūrai.

Ar analītiskajiem svāriem nosver sausos ogu izspiedu ekstraktus un izšķīdina metanolā, lai iegūtu koncentrāciju 100mg/ml. Pēc tam ar PBS buferšķīdumu atšķaida līdz 10mg/ml. Šādus koncentrātus var uzglabāt ledusskapī, lai atkārtoti izmantotu vairākiem eksperimentiem. Ogu ekstraktus atšķaida līdz vēlamajām koncentrācijām ar PBS

buferšķīdumu un vorteksē. Bakalaura darba ietvaros tika pētīti izspiedu ekstraktu efekti 1mg/ml, 0,2mg/ml un 0,004g/ml koncentrācijās.

2 μ l no ekstraktu katras koncentrācijas šķīduma iemēra 96 lauciņu plates vienā lauciņā un iemēra triplikātos, bet trīs lauciņos iemēra 2 μ l zileutona šķīdumu, kas kalpo kā zināma inhibitora kontrole. Visiem lauciņiem pievieno 38 μ l LOX metodes buferšķīdumu. Enzīma kontroles triplikāta lauciņos iemēra 40 μ l buferšķīduma.

Eppendorf mēģenē sagatavo reaģentus tā, lai katrā lauciņā varētu pievienot 40 μ l reakcijas *Mix*, kas sastāv no 36 μ l buferšķīduma, 2 μ l LOX *Probe* un 2 μ l 5-LOX enzīma. *Mix* vorteksē, pievieno mikroplates lauciņiem un pirms substrāta pievienošanas 10 minūtes inkubē istabas temperatūrā, un pēc tam uzņem fona fluorescenci reaģentu kontrolei. Tad sagatavo LOX substrātu, kas jāatšķaida 12500 reizes tā, lai katrā lauciņā varētu iemērīt 5x šķīduma 20 μ l. Ar buferi LOX substrātu atšķaida 1:25, un pakāpeniski turpina atšķaidīt, kamēr iegūst 1:500. To tālāk atšķaida 1:100, lai iegūtu 5x šķīdumu.

Plati ievieto mikroplašu lasītājā, ieslēdz kinētisko mērījumu režīmu un reģistrē fluorescenci 0., 5., 10., 15. un 20. minūtē pēc ievietošanas mikroplašu lasītājā, un no iegūtajiem datiem atņem fona fluorescenci. Atlikušos reaģentu uzreiz ievieto ledusskapī – 20 °C temperatūrā atkārtotai izmantošanai.

2.2.2. COX-1 inhibitoru skrīnings

Ciklooksigenāzes-1 inhibitoru skrīninga metodes pamatā ir fluorometriska prostaglandīna G₂ (PGG₂), COX-1 enzīma starpprodukta, koncentrācijas mērīšana. Fluorescenci mēra pie 535nm ierosinājuma un 587 nm emisijas viļņiem (Ex/Em=535/587 nm).



COX-1 reaģentu komplekts tiek uzglabāts -20 °C grādu temperatūrā, sargājot no gaismas. Eksperimenta sākumā reaģentus izņem no ledusskapja un ļaut atsilt istabas temperatūrā, taču COX-1 konteineram nodrošina vēsumu visu laiku, lai enzīms nezaudētu aktivitāti. No ledusskapī uzglabātajiem ogu izspiedu ekstraktiem (10mg/ml) sagatavo vēlamās koncentrācijas, atšķaidot ar PBS buferšķīdumu, un vorteksē.

Paraugus 10 reizes atšķaida ar buferšķīdumu un pa 10 μ l iemēra triplikātos 96-lauciņu baltajā platē. Kontrolei izveido trīs lauciņus ar neinhibētu COX-1 enzīmu un vēl trīs lauciņus pozitīvai referencei, kuros iepilda 2 μ l inhibitoru SC650 un 8 μ l buferšķīdumu.

200 reizes atšķaida COX *Cofactor*, ņemot 2 μ l COX *Cofactor* un 398 μ l testa buferšķīduma. Katra lauciņa reakcijai sagatavo 80 μ l *master mix*, kas sastāv no:

- 76 μ l testa buferšķīduma
- 1 μ l COX *Probe*
- 2 μ l atšķaidīta COX *Cofactor*
- 1 μ l COX-1 enzīma.

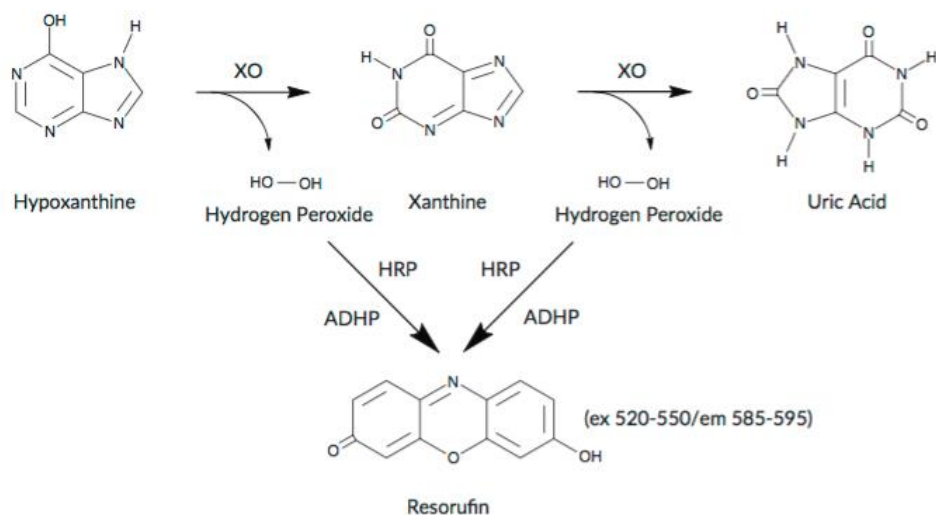
COX-1 enzīms ir liofilizēts pulveris, tāpēc sākumā flakonom pievieno 110 μ l destilēta dejonizēta ūdens, lai šķīdinātu COX-1. *Master mix* pagatavo tik, cik nepieciešams atkarībā no lauciņu skaita. Pirms arahidonskābes šķīduma pievienošanas ar mikroplašu lasītāju nosaka fona fluorescenci pie Ex/Em=535/587 nm. Fona fluorescenci izmanto kā reaģentu kontroli.

Pēdējo gatavo arahidonskābes šķīdumu tieši pirms lietošanas. 5 μ l arahidonskābes pievieno 5 μ l nātrija hidroksīda un vorteksē, pēc tam atšķaida desmit reizes ar 90 μ l destilēta dejonizēta ūdens. Arī arahidonskābes šķīdumu pagatavo tik daudz, lai katrā lauciņā varētu iemērīt 10 μ l. Arahidonskābi lauciņos vēlams pievienot ātri ar multi-kanālu pipeti, lai reakcija visos lauciņos sāktos vienlaicīgi.

Veic fluorescences mērījumus (Ex/Em=535/587 nm) kinētikas režīmā un mērījumus reģistrē laika punktos ar 5 minūšu intervālu līdz 20. minūtei. Atlikušos reaģentus uzglabā ledusskapī (-20°C).

2.2.3. Ksantīna oksidāzes inhibitoru pētīšanas metode

Ksantīna oksidāzes aktivitāti var noteikt pēc reakcijas produktu koncentrācijas, tostarp fotometriski mērot urīnskābes absorbciju pie 290nm (Nguyen *et al.*, 2006). Taču mēs modificējām spektrofotometrisko metodi, izmantojot *Cayman Chemical* reaģentus fluorimetriskai ksantīna oksidāzes mērīšanai. *Cayman Chemical* ksantīna oksidāzes fluorimetriskās metodes pamatā ir vairāku soļu enzimatiskā reakcija (skat. 3.1. att.) – ksantīna oksidāze oksidē hipoksiantīnu, kā blakusproduktu veidojot ūdeņraža peroksīdu. Mārrutku peroksidāzes klātbūtnē ūdeņradis reaģē ar ADHP (10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazīnu) attiecībā 1:1, producējot resorufīnu, produktu ar izteikti augstu fluorescenci. Resorufīna fluorescenci mēra pie 520-550 nm ierosinājuma un 585-595 nm emisijas viļņiem.



3.1. att. *Cayman Chemical* ksantīkoksīdāzes fluorimetriskās mērīšanas enzimatiskās reakcijas (Cayman Chemical)

10 mg/ml ogu izspiedu ekstraktus atšķaida ar PBS buferšķīdumu, lai iegūtu koncentrācijas 0,5, 0,25, 0,125, 0,00625 un 0,003125 mg/ml. 96-lauciņu melnajā platē pa 50 μ l triplikātos iemēra katra parauga koncentrāciju šķīdumus. Kontrolei izveido 3 lauciņus ar neinhibētu ksantīna oksidāzi un 3 lauciņus bez vielām (reaģentu lauciņus). Ar PBS buferi šķīdina ksantīna oksidāzi līdz 0,1 U/ml un katram lauciņam, izņemot reaģentu kontroles tripletam, pievieno 30 μ l. Inkubē 15 minūtes istabas temperatūrā.

Pēc tam katram lauciņam pievieno 30 μ l 0,1 mM ksantīna šķīduma un inkubē 30 minūtes istabas temperatūrā. Sākumā pagatavo 100mM ksantīna šķīdumu – 15mg vielas ($M=152,11$ g/mol) izšķīdina 1ml 1M nātrija hidroksīda. Lai iegūtu 0,1mM jāatšķaida vēl 1000 reizes ar buferšķīdumu.

No *Cayman Chemical* komplekta pagatavo reaģentu *mix* jeb kokteili, kas satur 4,9ml komplekta buferšķīduma, 50 μ l detektora (ADHP) un 50 μ l mērrutku peroksidāzes. *Mix* jāizmanto 10 minūšu laikā. Katram lauciņam pievieno 50 μ l kokteiļa un inkubē 37°C grādos 45 minūtes, pēc 10 min mēra fluorescenci $Ex=520-550$ nm un $Em=585-595$ nm.

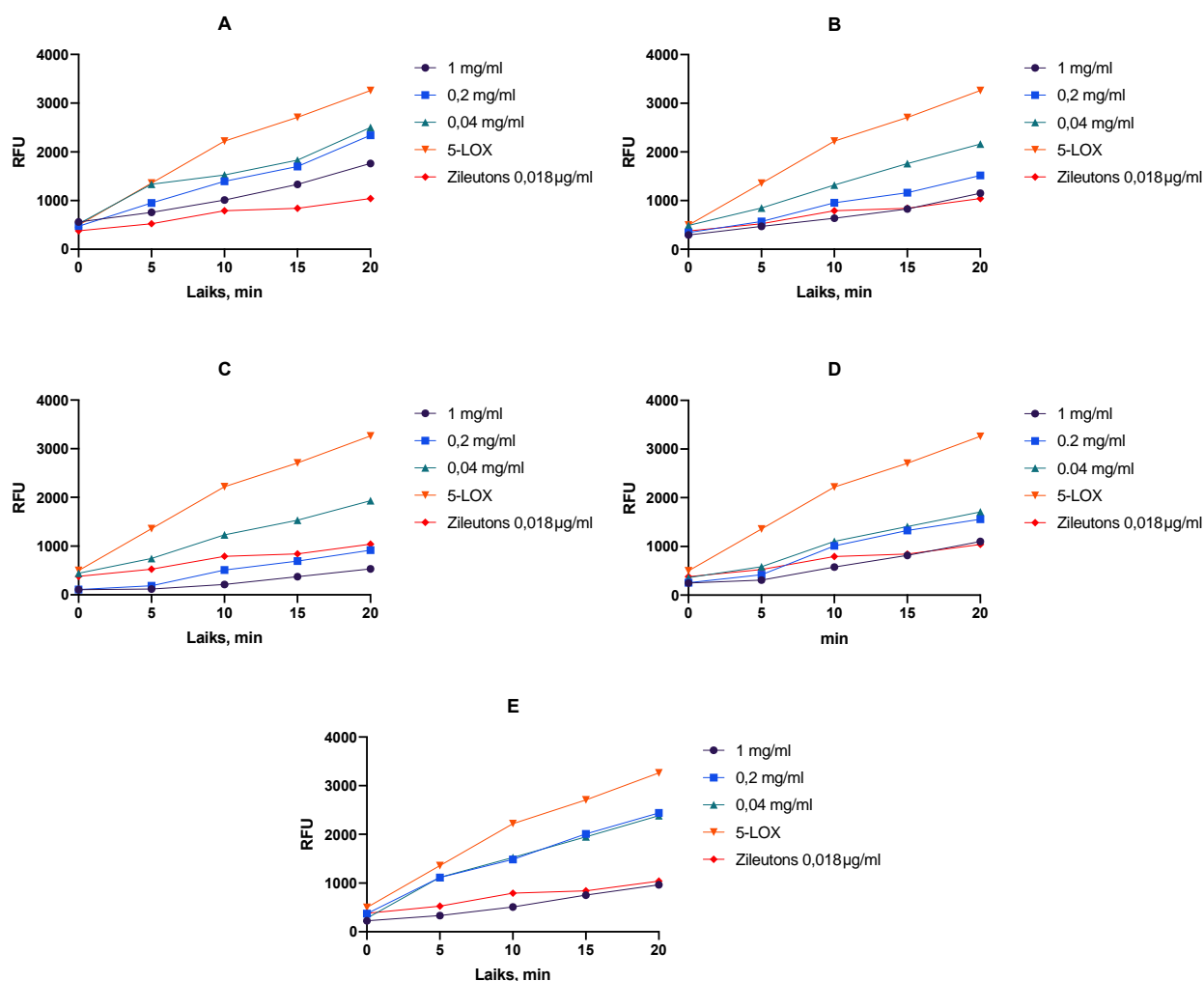
2.3. Datu statistiskā analīze

Datu analīzei izmantotas programmas *GraphPad Prism 8* un *Microsoft Excel*. Mērījumi veikti 2-3 reizes un dati uzrādīti kā vidējās vērtības ar standartnovirzi (SD). Rezultātu statistiskā analīze veikta ar *one-way analysis of variance (ANOVA)* un *Dunnett's Multiple Comparison test*. Atšķirība starp grupām pieņemta par statistiski ticamu, ja $P<0,05$.

3. REZULTĀTI

3.1. 5-LOX aktivitātes inhibīcija

Pārbaudījām piecu *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu 5-lipoksigenāzes aktivitātes inhibīcijas īpašības ar 5-lipoksigenāzes inhibitoru skrīninga metodi. Katra ekstrakta efekts testēts 0,04, 0,2 un 1 mg/ml koncentrācijās. Eksperiments tika atkārtots divas reizes, kopumā iegūstot 6 mērījumus katram paraugam. Attēlā 3.1. redzamas paraugu fluorescences izmaiņas laika gaitā.



3.1. att. Ogu izspiedu ekstraktu un zileutona 5-LOX inhibīcijas kinētika

Apzīmējumi: A – mellenes, B – krūmmellenes, C – lielogu dzērvenes, D – purva dzērvenes un D – brūklenes, RFU – relatīvās fluorescences vienības.

5-LOX no substrāta veido starpproduktu, kurš uzreiz reaģē ar LOX Probe un fluorescē. Enzīmu reakcija notiek laika gaitā, tāpēc mērījumi fiksēti ar 5 minūšu intervālu līdz izreaģē substrāts. Enzīma-substrāta reakcijas kinētika uzrādīta līdz 20. minūtei, jo pēc tam daļai

ekstraktu iestājas plato. Līknēs vidējās eksperimentu RFU vērtības ilustratīvi attēlo, cik daudz produkta rodas laika gaitā, līdz ar to parādot, kā ekstrakti kinētiski ietekmē enzīma darbību. Mazākas RFU vērtības jeb mazāka produkta veidošanās liecina par attiecīgi lielāku ekstrakta inhibīcijas spēju. Kā references inhibitors izmantots zileutons koncentrācijā 0,018 µg/ml.

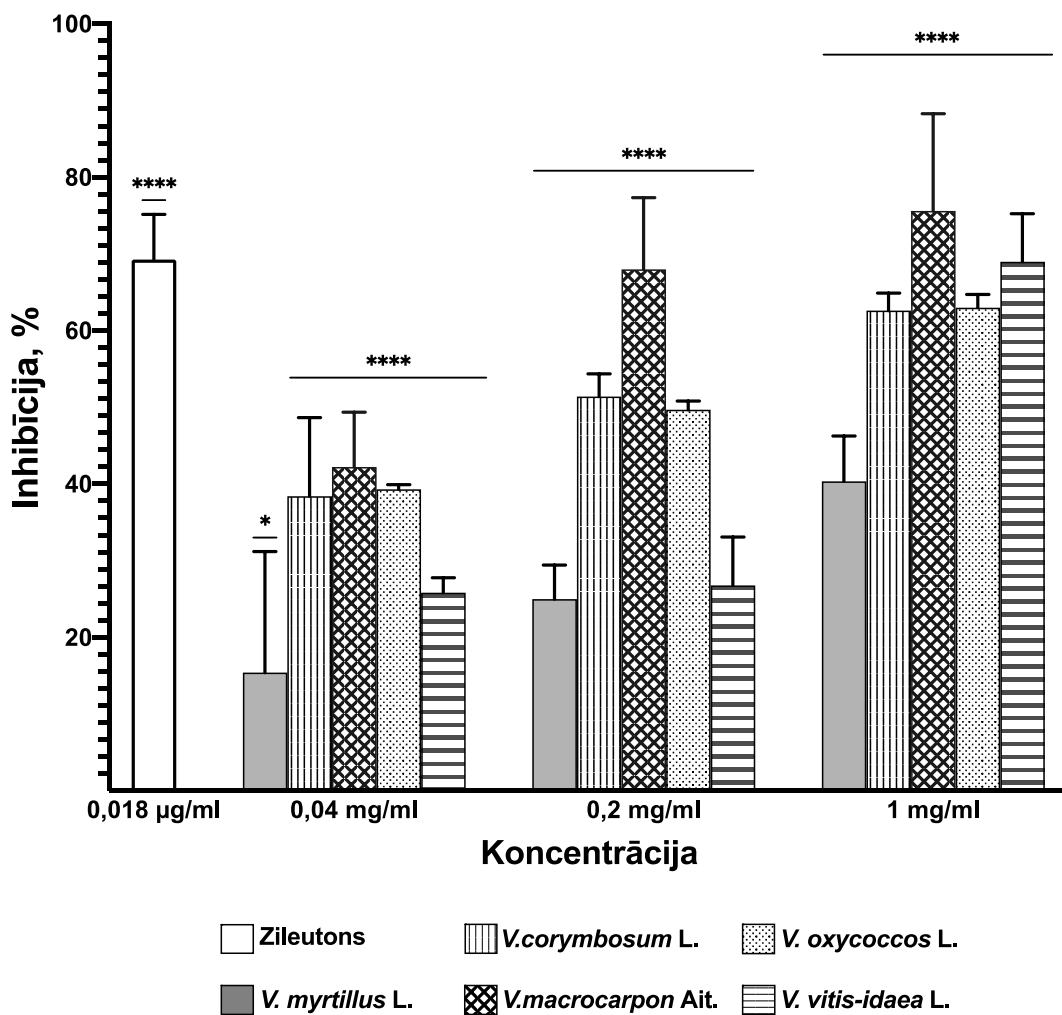
Mellenes 0,04 mg/ml ekstraktam (skat. 3.1.att. A) pirmās piecas minūtes praktiski nav efekta un RFU gandrīz sakrīt ar neinhibēta enzīma līkni. Vislabāko rezultātu uzrādīja lielogu dzērvene, taču tās 0,04 mg/ml ekstrakts neizceļas ar ievērojami labāku inhibīciju, ja salīdzina ar citiem 0,04 mg/ml ekstraktiem. Brūklenes ekstraktam koncentrācijās 0,2 un 0,04 mg/ml laika gaitā novērojams ļoti līdzīgs efekts, savukārt 1 mg/ml ekstrakts uzrādīja vairāk nekā 2,5 reizes lielāku inhibīciju, salīdzinot ar 0,2 un 0,04 mg/ml ekstraktiem.

Tomēr produkta rašanās kinētikas līknēm ir tikai ilustratīva loma, jo izmantotas vidējās RFU vērtības bez SD parādīšanas uz līknēm. Tāpēc inhibīcijas % aprēķins ir precīzāks rezultātu atspoguļojums – 3.2. att. dati.

3.2. att. parādītie dati aprēķināti ar *one-way ANOVA* un sekojošu *Dunnett's Multiple Comparison test*. P vērtība rēķināta attiecībā pret kontroles grupu – neinhibētu 5-LOX enzīmu bez pievienota zileutona vai ogu ekstraktiem –, kur aktivitāte pieņemta 100% un attiecīgi inhibīcija 0%. Stabiņi reprezentē katra parauga 6 mērījumu vidējo vērtību ar standartnovirzi (SD).

Visi 0,04 mg/ml paraugi statistiski ticami samazināja enzīma darbību ar P vērtību <0,0001, tikai 0,04 mg/ml mellenes ekstraktam ir lielāka P vērtība (P<0,05). Starp 0,04mg/ml ekstraktiem vislielākā inhibīcija ir lielogu dzērvenei – 42%, tai sekoja dzērvenes – 39%, krūmmellenes – 38%, brūklenes –26% un mellenes ar 15%.

Visi ekstrakti 0,02 mg/ml koncentrācijā statistiski ticami inhibē (P<0,0001) 5-LOX enzīma aktivitāti. Ja 0,04 mg/ml koncentrācijā trīs ekstraktiem efekts (krūmmelleņu un abu dzērveņu) bija diezgan tuvu diapazonā 38-42%, tad 0,02 mg/ml koncentrācijā lielogu dzērvenei jau ir par 17% lielāka inhibīcija nekā krūmmellenei un purva dzērvene, attiecīgi 68%, 51% un 50%. Mellenes ekstrakts 0,02 mg/ml koncentrācijā par 25% samazināja 5-LOX enzīma aktivitāti un brūklene par 27%.



3.2. att. *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu efekts uz 5-LOX enzimatisko aktivitāti

Statistiskais nozīmīgums norādīts attiecībā pret enzīma aktivitāti bez zileutona vai ekstraktiem, kas pieņemta par 0%. Statistiski ticama nozīme norādītā kā * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$.

Apzīmējumi: *V. myrtillus* L. – mellenes, *V. corymbosum* L. – krūmmellenes, *V. macrocarpon* Ait. – lielogu dzērvenes, *V. oxycoccus* L. – purva dzērvenes, *V. vitis-idaea* L. – brūklenes.

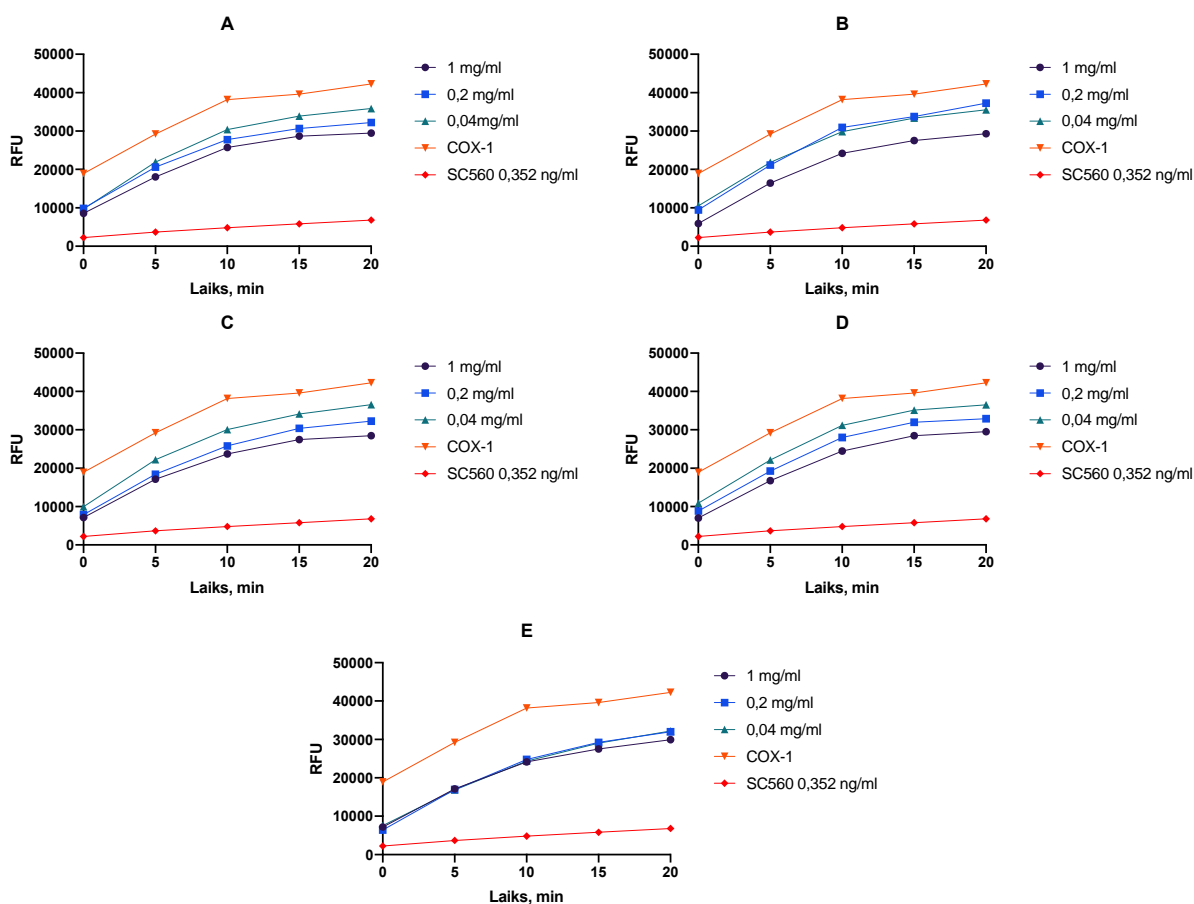
Arī vislielākajā eksperimentā pētītajā koncentrācijā (1mg/ml) lielogu dzērvenes ekstrakts ir visspēcīgākais 5-LOX inhibitors no *Vaccinium spp.* ogām ar 76% inhibīciju. Būtiski, ka brūklenēm 1 mg/ml koncentrācijā ievērojami palielinājās inhibējošais efekts līdz 69%, ierindojot to otrajā vietā pēc ogu ekstraktu inhibīcijas spējas. 1mg/ml krūmmelleņu un purva dzērveņu ekstraktiem ir vienāds efekts - 63%, bet koncentrācijās 0,04 un 0,2 mg/ml ir tikai viena 1% starpība (attiecīgi koncentrācijā 0,04 mg/ml 38% un 39%, un 0,2 mg/ml koncentrācijā 50% un 51%). Vismazākais efekts uz enzīma aktivitāti ir mellenes ekstraktam ar inhibīciju – 40%.

Lai noskaidrotu, vai ir kāda sakarība starp ogu izspiedu ekstraktu ķīmisko sastāvu un ietekmi uz 5-LOX enzīma aktivitāti, ar *Prism 8* aprēķinātas korelācijas ar kopējo polifenolu,

antocianīnu un procianidīnu daudzumu (g/100g), bet spēcīga pozitīva sakarība atrasta tikai ar ogu ekstraktu kopējo polifenolu daudzumu, par ko liecina Pīrsona koeficients $r=0,7279$. Tātad, jo lielāks polifenolu daudzums, jo lielāka ekstrakta 5-LOX aktivitātes inhibējošā efektivitāte. Korelācijai izmantoti publicētie *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu ķīmiskie bioloģiski aktīvo vielu sastāvi (Muceniece *et al.*, 2019).

3.2. COX-1 aktivitātes inhibīcija

Līdzīgi kā 5-LOX arī COX-1 metodē laika punktos tika reģistrēta enzimatiskās reakcijas produkta fluorescences intensitāte, lai tādējādi noteiktu 0,04, 0,2 un 1mg/ml ogu ekstraktu efektu uz COX-1 enzīma aktivitāti. Inhibīciju raksturo zemākas RFU vērtības par neinhibēta enzīma kontroles RFU. Kā pozitīva kontrole izmantots SC560, COX-1, inhibitors 0,352 ng/ml. Rezultāti iegūti divos atkārtojumos ar 6 mērījumiem. 3.4. att. redzami ar *one-way ANOVA* un ar *Dunnett's Multiple Comparison test* aprēķinātie dati un stabiņi uzrādīti kā visu mērījumu vidējās vērtības ar standartnovirzi (SD).

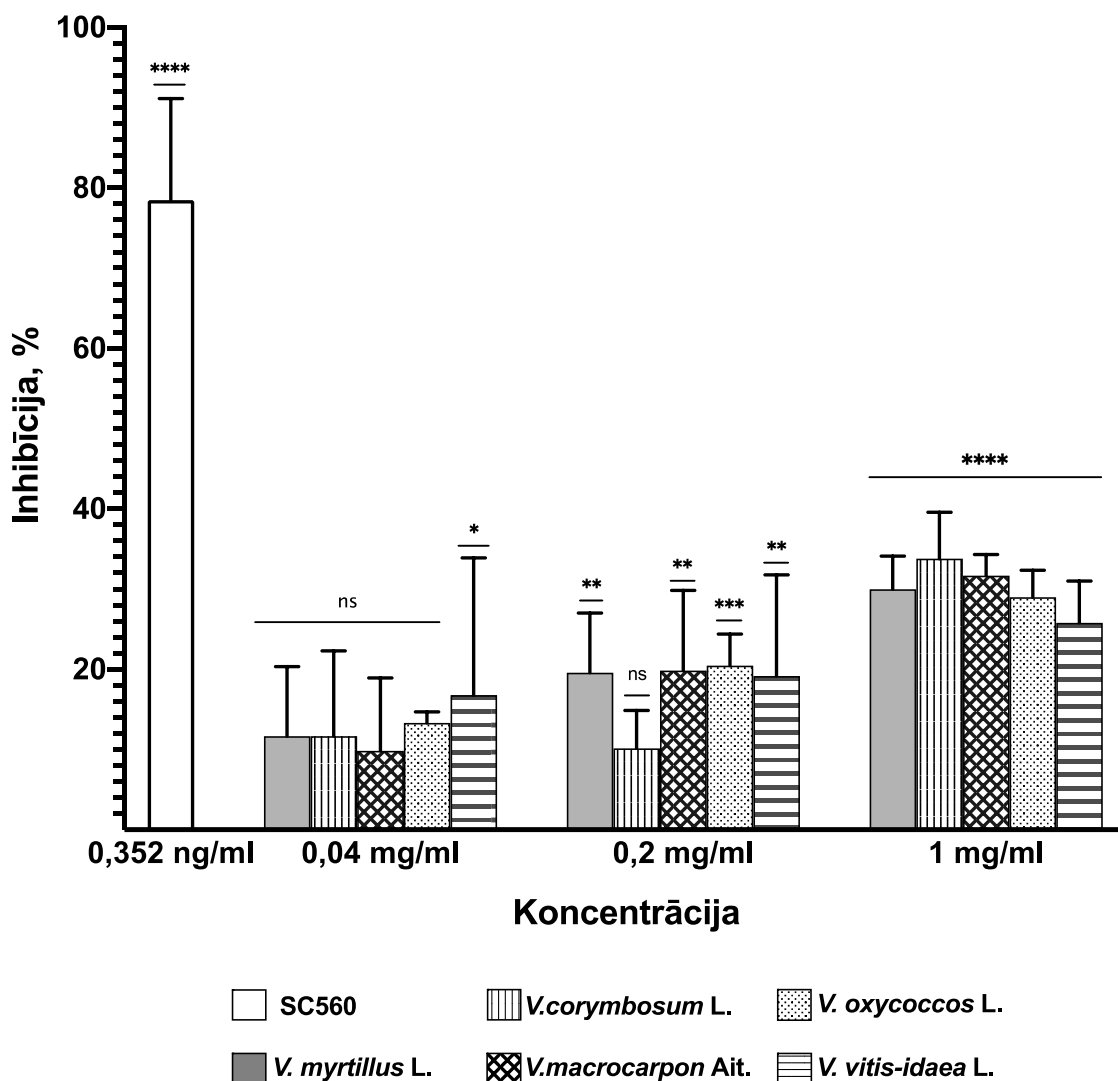


3.3. att. Ogu izspiedu ekstraktu un zileutona COX-1 inhibīcijas kinētika

Apzīmējumi: A – mellenes, B – krūmmellenes, C – lielogu dzērvenes, D – purva dzērvenes un D – brūklenes.

Ilustratīvajām kinētikas līknēm izmantotas katra ekperimenta vidējās RFU vērtības. Kinētikas līknes (skat. 3.3.att.) liecina, ka lielākā daļa ogu ekstraktu COX-1 aktivitātes inhibīcijas plato stāvokli sasniedz pēc 15. minūtes. A, C un D paralēlās koncentrāciju līknes norāda uz no ekstrakta koncentrācijas atkarīgu inhībīciju. B un E attēlos 0,04 un 0,2 mg/ml koncentrācijas uzrāda ļoti līdzīgu kinētiku, precīzāk, tikai 2% atšķirību.

3.4. attēls liecina, ka koncentrācijā 0,04 mg/ml ogu ekstrakti, izņemot brūkleņu ekstraktu, neinhībē COX-1 aktivitāti, salīdzinot ar neinhībēta enzīma kontroli (bez SC560 vai ogu ekstraktiem), kas pieņemta par 0% inhībīciju. 0,04 mg/ml brūkleņu ekstrakts par 17% inhībēja COX-1 enzīmātisko aktivitāti.



3.4. att. *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu COX-1 inhībīcija

Statistiski ticama nozīme norādīta kā *-P<0,05, **-P<0,01, ***-P<0,001, ****-P<0,0001, bet ns – nav statistiski ticams rezultāts.

Starp ogu izspiedu paraugiem koncentrācijā 0,2 mg/ml visspēcīgākais COX-1 aktivitātes inhibētājs ir purva dzērveņu ekstrakts – 21% ($P < 0,001$). Arī melleņu, lielogu dzērveņu un brūkleņu ekstrakti uzrāda statistiski ticami inhibīciju, attiecīgi 20%, 20% un 19%. Savukārt krūmmelleņu 0,2 mg/ml ekstrakta rezultāts nav statistiski ticami.

Visu *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu efekts koncentrācijā 1 mg/ml uz enzīma kinētiku ir ticams ar $P < 0,0001$. Lai gan 0,04 un 0,2 mg/ml krūmmelleņu ekstraktam nebija statistiski ticama aktivitāte, starp 1 mg/ml rezultātiem tieši krūmmellenēm novērojama vislielākā inhibīcija – 34%. Pēc tam seko lielogu dzērvenes – 32%, mellenes – 30%, purva dzērvenes – 29% un brūklenes – 26%.

Par spēcīgu sakarību starp ekstraktu spēju saistīties ar COX-1 enzīmu un antocianīnu sastāvu norāda Pīrsona koeficients $r = 0,7449$. Ekstraktiem ar lielāku antocianīnu daudzumu paredzama lielāka COX-1 inhibīcija.

3.3. Ksantīna oksidāzes aktivitātes inhibīcija

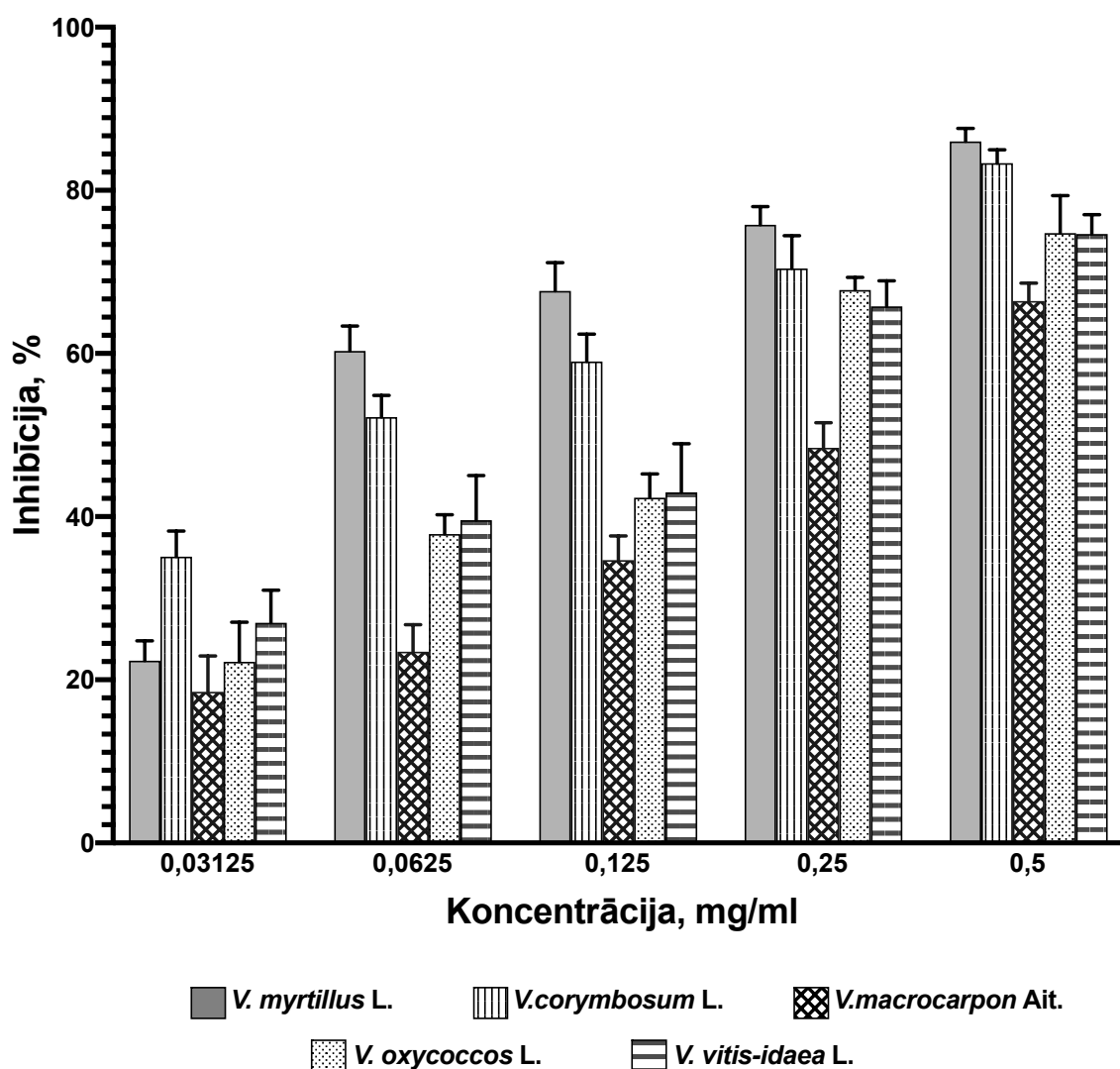
Lai noskaidrotu *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu ietekmi uz ksantīna oksidāzes aktivitāti (skat. 3.5. att.), tika salīdzināta enzīma aktivitāte ar ekstraktiem pret kontroles grupu: enzīms bez ekstraktiem, kas pieņemts par 100% aktīvu un attiecīgi 0% inhibētu. Metode atkārtota trīs reizes un pēc datu apstrādes ar ANOVA un *Dunnnett's Multiple Comparison test*. Visi ogu ekstraktu efekti 0,003125, 0,0625, 0,125, 0,25 un 0,5 mg/ml koncentrācijās atzīti kā statistiski nozīmīgi ($P < 0,0001$).

Vismazākajā pētītajā koncentrācijā (0,03125 mg/ml) lielāko efektu uzrāda krūmmellenes ar inhibīciju 35%, kam seko brūklene – 27%, mellenes un purva dzērvenes ar 22%, un lielogu dzērvene – 19%.

0,0625 mg/ml mellenes ekstrakts uzrāda gandrīz 3 reizes lielāku enzīmu aktivitātes inhibīciju (60%) nekā 0,003125 mg/ml koncentrācijā. Otrs augstākais rādītājs ir krūmmellenei (52%), tad seko brūklene (40%), purva dzērvene (38%) un lielogu dzērvene (23%). Inhibīcijas aktivitāte tādā pat secībā ir arī 0,125 mg/ml ekstraktiem, sākot ar melleni, krūmmelleni, brūkleni, purva dzērveni un beidzot ar lielogu dzērveni, attiecīgi 68%, 59%, 43%, 42% un 35%.

Koncentrācijā 0,25 mg/ml ogu izspiedu ekstraktu ksantīna oksidāzes aktivitātes inhibīcija ir sekojoša: lielogu dzērvenes – 48%, brūklenes – 66%, purva dzērvenes – 68%, krūmmellenes – 70% un mellenes – 76%. Visi 1 mg/ml ekstrakti samazināja enzīma darbību uz vairāk kā pusi no iespējamās aktivitātes. Visspēcīgākā ietekme uz XO aktivitāti ir mellenēm – 86%, kam seko krūmmellene ar 3% starpību - 83%. Lielākajā koncentrācijā purva

dzērvenēm un brūklenēm ir vienāda inhibīcija – 75%, bet liellogu dzērvenēm vismazākā grupas ietvaros – 66%.



3.5. att. *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu efekts uz ksantīna oksidāzes aktivitāti. Visi mērījumi ir statistiski ticami $P < 0,0001$, stabīņi reprezentē 9 mērījumu vidējās vērtības ar standartnovirzi.

Sakarība atrasta arī starp ietekmi uz ksantīna oksidāzes aktivitāti un ekstrakta ķīmisko sastāvu. Korelācija raksturojama kā spēcīga sakarība pēc Pīrsona koeficienta $r = 0,6755$. Jo lielāks antocianīnu daudzums ekstraktā, jo lielāka enzīma inhibīcija. Kopumā visi ekstrakti uzrāda spēju saistīties un bloķēt ksantīna oksidāzes enzīmu atkarībā no koncentrācijas.

4. DISKUSIJA

Pēdējo dekāžu laikā ilgtspējīgā pārtikas ražošana un blakusproduktu izmantošana ir kļuvusi par mūsdienu lauksaimniecības un pārtikas rūpniecības sastāvdaļu. Vienlaikus pieaugusi izpratne par augu bioaktīvajiem savienojumiem un hronisku slimību profilaksi (Bucić-Kojić *et al.*, 2020). Ogu sulas pārstrādes procesā veidojas aptuveni 30% izspiedu, kas, lai gan atzītas par lētu alternatīvu vērtīgu fitoķīmisku vielu iegūšanai, šobrīd lielākoties tiek pārstrādātas kā pārtika dzīvniekiem, kompostētas, izmantotas biogāzes ražošanai vai vienkārši iznīcinātas (Struck *et al.*, 2016). Izspiedu ķīmiskais sastāvs izpēte un izmantošana pārtikas un medicīnas jomās aktualizējusies tikai pēdējo gadu laikā, tāpēc pētījumu skaits ir ierobežots.

Hronisks iekaisums ir zināms kā būtisks iemesls dažādu slimību attīstībā, tostarp otrā tipa diabēta, vēža, aptaukošanas, artrīta, neurodeģeneratīvu un kardiovaskulāru slimību attīstībā. Pētījumi liecina, ka ar augļiem un dārzeņiem bagāts uzturs saistāms ar mazāku slimību risku, jo satur ne tikai svarīgus vitamīnus un minerālus, bet arī bioloģiski aktīvus savienojumus kā polifenolus un fenolskābes (Joseph *et al.*, 2014). Tieši ogas tiek uzskatītas par vienu no lielākajiem bioaktīvo vielu avotiem uzturā (Skrovankova *et al.*, 2015).

Vaccinium ģintij raksturīgs plašs fenolsavienojumu spektrs, kas ir pamats ogu veselību veicinošajām īpašībām, piemēram, apstiprināts, ka *Vaccinium* augi samazina metaboliskā sindroma un deģeneratīvu slimību risku. Ogas ir izteikti bagātas ar flavonoīdiem, ieskaitot antocianīnus, flavonolus un proantocianidīnus, kas pazīstami ar antioksidatīvajām spējām, pretiekaisuma, pretvēža, antimikrobiālu un preaptaukošanās darbību (Karppinen *et al.*, 2016). Ņemot vērā, ka izspiedās paliek liela daļa vērtīgo savienojumu, arī *Vaccinium* ogu izspiedu ekstraktiem ir potenciāls tikt komerciāli izmantoti farmācijas, kosmētisko produktu un pārtikas rūpniecībā (Su, 2012; Struck *et al.*, 2016).

Viena no polifenolu pretiekaisuma īpašībām ir arahidonskābes metabolisma ceļā iesaistīto enzīmu inhibīcija un no tā izrietošais eikosanoīdu biosintēzes nomākums. Polifenolu spēja ietekmēt FLA2, COX un LOX enzīmu aktivitāti un attiecīgi samazināt arahidonskābes atbrīvošanos, prostaglandīnu un leukotriēnu sintēzi tiek uzskatīta par vienu no svarīgākajiem šo savienojumu pretiekaisuma mehānismiem (Yahfoufi *et al.*, 2018).

Mūsu pētījumā visi pieci *Vaccinium spp.* izspiedu ekstrakti no koncentrācijas atkarīgā veidā inhibēja 5-LOX enzīmatisko aktivitāti. Līdzīgi arī aveņu un vīnogu izspiedu ekstraktiem novērota *in vitro* 5-LOX inhibīcija (Szymanowska and Baraniak, 2019; Bucić-Kojić *et al.*, 2020). Mūsu eksperimentos visspēcīgāko inhibīciju (76%) no piecu ogu ekstraktiem uzrādīja lielogu dzērvene 1mg/ml koncentrācijā. Brūkleņu, purva dzērveņu un krūmmelleņu ekstrakti 1mg/ml pārsniedza 50% enzīma aktivitātes inhibīcijas robežu, un to inhibīcija bija attiecīgi

69%, 63% un 63%. Mellenes ekstraktam 1mg/ml koncentrācijā novērojām 40% enzīma aktivitātes nomākumu. Knaup *et al.* (2009) publikācijā aprakstīts, ka no mellenes izolētiem antocianīniem un to glikozīdiem delfinifina 3-O-glikozīds un delfinidīna-3-galaktozīds uzrādīja visaugstāko no cilvēka neitrofilu granulocītiem izolēta 5-LOX inhibīciju (Knaup *et al.*, 2009). Muceniece *et al.* (2019) pētījumā delfinifina 3-O-glikozīda un delfinidīna-3-galaktozīda daudzumu varēja izmērīt tikai melleņu un krūmmelleņu ekstraktos. Mēs neatradām korelāciju starp antocianīnu sastāvu *Vaccinium spp.* izspiedu ekstraktos un to 5-LOX enzīma inhibīciju, taču atradām efekta stipru saistību ar polifenolu daudzumu (pēc Pīrsona korelācijas koeficienta $r=0,7279$). Arī Szymanowska and Baraniak (2009) ziņo, ka, lai gan no aveņu izspiedām izolētiem antocianīniem ir 5-LOX inhibīcija, sakarība starp inhibējošo aktivitāti un antocianīnu sastāvu nepastāv. Pēc mūsu datiem mellenes uzrādīja vismazāko inhibīciju, un korelācija ar antocianīnu līmeni netika atrasta, taču ar kopējo polifenolu daudzumu tika. Iespējams, ka citas polifenolu apakšklases ir būtiskākas 5-LOX enzīmātiskajai inhibīcijai, nenoliedzot, ka arī antocianīniem ir ietekme uz enzīma aktivitāti.

Visiem pētītajiem ekstraktiem novērojām no koncentrācijas atkarīgu COX-1 aktivitātes inhibīciju un visaugstāko inhibīciju (34%) uzrādīja krūmmelleņu ekstrakts 1 mg/ml koncentrācijā. Pārējo ogu izspiedu ekstraktu COX-1 inhibīcijas spēja 1mg/ml koncentrācijā novērota šādā secībā – dzērvenes (32%) > mellenes (30%) > purva dzērvenes (29%) > brūklenes (26%). Iepriekšējā pētījumā (Kunrade *et al.*, 2020) tika pētīta šo pašu *Vaccinium* ogu izspiedu ekstraktu ietekme uz COX-2 enzīmātisko aktivitāti. 1mg/ml koncentrācijā krūmmellenēm, lielogu un purva dzērvenēm novēroja efektu lielāku par 50%, brūklenēm aptuveni 50%, savukārt, mellenēm zem 30%. Tāpat kā mūsu pētījumā arī Kunrade *et al.* (2020) novēroja no koncentrācijas atkarīgu inhibīciju un vislielāko aktivitāti krūmmellenes ekstraktam. Salīdzinot rezultātus, secinām, ka *Vaccinium* ogu izspiedu ekstrakti visās koncentrācijās uzrāda lielāku inhibējošo efektu uz COX-2 nekā uz COX-1 aktivitāti.

Antocianīniem kopumā apstiprināti vairāki pretiekaisuma darbības mehānismi, tostarp piemīt dažādas pakāpes *in vitro* COX-1 un COX-2 inhibīcija (Domitrovic, 2011). Seeram ar kolēģiem (2003) pētīja antocianīnu ietekmi uz COX aktivitāti un novēroja izteiktāku COX-2 aktivitātes inhibīciju. Zināms, ka antocianīnu efekts atkarīgs no brīvo hidroksilgrupu daudzuma, tāpēc, piemēram, cianidīns inhibē enzīmu aktivitāti spēcīgāk par saviem glikozīdiem (Domitrovic, 2011). Arī mēs atradām stipru, pozitīvu sakarību ($r=0,7449$) starp COX-1 enzīmātiskās aktivitātes inhibīciju un antocianīnu sastāvu izspiedu ekstraktos.

Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi (NPL) pretiekaisuma, antipirētiskos un analgētiskos efektus nodrošina caur ciklooksigenāžu inhibīciju, apturot arahidonskābes metabolisma ceļu. Taču ne visi AS mediatori ir iekaisumu veicinoši. COX-1 uzskata par konstitutīvi ekspressētu,

bet COX-2 ir inducējams enzīms. Tas ir novedis pie plaši pieņemtas hipotēzes, ka COX-1 producē homeostāzes, bet COX-2 patofizioloģiskus eikosanoīdus. Šobrīd nav pilnībā drošu NPL lietošanai terapijā, un kā potenciālas blaknes jāmin gastrointestinālā trakta bojājumus un asiņošano, palielinātu asinsspiedienu, miokarda infarktu un insultu risku. Savukārt selektīvi COX-2 inhibitori koksibi, lai gan nenomāc COX-1 darbību un attiecīgi kungā citoprotektīvo PG sintēzi, tomēr ievērojami paaugstina kardiovaskulāros riskus, jo palielinās TXA₂ līmenis (Sala *et al.*, 2018). Mūsu rezultāti kopā ar Kunrades *et al.* (2020) pētījumu, liecina, ka *Vaccinium* spp. ogu izspiedu ekstrakti ir selektīvāki COX-2 inhibitori, kas ir galvenā no ciklooksigenāzēm iekaisuma laikā. Vienlaikus uzrādot arī COX-1 aktivitātes inhibīciju, jo, neskatoties uz citoprotektīvo PG un homeostāzes funkciju, arī COX-1 ir loma iekaisuma procesā. Ņemot vērā, ka klasisko NPL izmantošana nomāc COX-1 un izraisa kungā bojājumu un asiņošano, bet celekoksibu gadījumā vispār neietekmējot COX-1, palielinās kardiovaskulārs risks. Iespējams, ka mūsu novērotā ekstraktu COX-1 aktivitātes inhibīcija, kas 1mg/ml koncentrācijā nepārsniedza 34% ir pat vēlāma, jo tikai daļēji nomāc enzīma darbību, saglabājot vairāk nekā 60% aktivitāti, lai nodrošinātu homeostāzi.

Vaccinium spp. ogu izspiedu ekstraktu gan 5-LOX, gan COX enzīmu aktivitātes inhibīcija ir daudzsološs pamats, lai ogu izspiedas izmantotu pretiekaisuma īpašību dēļ, jo tās spēj ietekmēt divus no arahidonskābes metabolisma ceļiem. Šobrīd uzskata, ka duāla COX-2/5-LOX enzīmu aktivitātes inhibīcija ir virziens jaunām pretiekaisuma zālēm ar labāku terapeitiskās drošības profilu. Turklāt duālai COX-2/5-LOX inhibīcijai novērota nozīme arī tādu slimību kā vēzis un neirodeģeneratīvu traucējumu kā Alcheimera un Parkinsona slimību risku samazināšanā (Jaismy *et al.*, 2018).

Kopumā pētījumu par tiešu COX un LOX enzīmu inhibīciju ir salīdzinoši maz. Daudz vairāk pētījumi apskata ogu ekstraktu vai ekstraktu atsevišķu frakciju kompleksākas iekaisuma sistēmas (signālceļus, receptoru mijiedarbības, mRNS, transkripcijas faktoros utt.) šūnu līnijās vai dzīvnieku modeļos. Gan antociānīniem, gan kopumā flavonoīdiem atklāta inhibējoša ietekme uz kodola transkripcijas faktora κB (NF-κB) signālceļu, jo tā kaskādes ietekmē virkni iekaisuma mediatoru ekspresiju, tostarp arī arahidonskābes metabolisma regulāciju (Yahfoufi *et al.*, 2018). Arī melleņu polifenoliem (Karlsen *et al.*, 2010), krūmmelleņu lapu flavonoīdu ekstraktam (Shi *et al.*, 2017) un liellogu dzērveņu ekstraktam (Glisan *et al.*, 2016) atklāta spēja nomākt ar NF-κB signālceļu saistītus procesus. Mūsu darbā izmantotie izspiedu ekstrakti Kunrade *et al.* (2020) pētījumā inhibēja citosola NF-κB pārvietošanos uz kodolu (Kunrade *et al.*, 2020). Tātad *Vaccinium* izspiedu ekstrakti var ietekmēt AS metabolismu gan tieši saistoties ar AS enzīmiem, gan ietekmējot to regulējošos signālceļus.

Pētījumi liecina, ka oksidatīvajam stresam ir patofizioloģiska loma hronisku iekaisuma slimību attīstībā. Polifenoli pazīstami ar antioksidantu spējām, piemēram, “savācot” ROS, tādējādi regulējot iekaisuma singālceļus. Tie inhibē arī dažādu enzīmus, kas atbild par ROS ģenerēšanu (Yahfoufi *et al.*, 2018). Viens no brīvos radikāļus veidojošajiem enzīmiem ir ksantīna oksidāze. Polifenolu un fenolskābju pretiekaisuma darbība ir pētīta kā ksantīna oksidāzes aktivitātes inhibīcija reizē ar COX-2 aktivitātes inhibīciju. Tika atrasts, ka ferulskābe, gallu skābe un tām radniecīgi fenolsavienojumi pretiekaisuma efektu uzrāda vienlaicīgi inhibējot šo abu enzīmu aktivitāti (Nile *et al.*, 2016).

Šobrīd tiek ziņots, ka hiperurkēmiju saista arī ar hipertensiju, aptaukošanos un nieru slimībām, tāpēc XO uzskata par vienu no terapeitiskajiem mērķiem (Zhang *et al.*, 2017). Mūsu rezultāti liecina, ka *Vaccinium* ogu izspiedu ekstrakti no koncentrācijas atkarīgā veidā inhibē ksantīna oksidāzes enzimatisko aktivitāti. 0,5 mg/ml koncentrācijā vislielāko inhibīciju (86%) uzrādīja melleņu izspiedas, tām sekoja krūmmellenes (83%), brūklenes un purva dzērvenes (75%) un lielogu dzērvene (66%).

Agrāki pētījumi norāda, ka flavonoīdiem ir spēja inhibēt XO, kā arī ziedot ūdeņraža atomus brīvajiem radikāļiem. Piemēram, salvijas (*Salvia verbenaca* L) ekstrakts uzrādīja duālu darbību, gan samazinot XO aktivitāti, gan “savācot” (ang.val. *scavenging*) superoksīda anjona radikāli (Belkhiri *et al.*, 2017). No zilenēm (*V. uliginosum* L), kas ir radniecīgs augs mūsu pētītajām ogām, izolētie flavonoīdi (miricetīns, kvercīns, laricitrīns un siringetīns un to glikozīdi) *in vitro* inhibēja XO enzimatisko darbību, tāpat arī novēroja to superoksīda un hidroksilradikāļu *scavenging* aktivitāti (Kim *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2017) pētījumā antociānīniem bagāti saldā kartupeļa (*Ipomoea batatas* L) ekstrakti uzrādīja lielākoties atgriezenisku, bet arī miksētu XO inhibīciju, veidojot antociānīnu-XO kompleksu, kas neļauj ksantīnam saistīties ar enzīma aktīvo centru un samazina enzimatisko aktivitāti (Zhang *et al.*, 2017). Līdzīgi arī mēs atklājām pozitīvu korelāciju ($r=0,6755$) starp *Vaccinium* ogu izspiedu antociānīnu daudzumu un efektu ar kādu ekstrakti samazina XO enzimatisko aktivitāti.

Mūsu *in vitro* testos iegūtie rezultāti apliecina, ka ogu ekstraktiem ir pretiekaisuma īpašības, tomēr neparāda kompleksās attiecības un mijiedarbības, kas notiek *in vivo*. Jāizceļ, ka fenolsavienojumu spēju labvēlīgi ietekmēt veselību strikti ierobežo biopieejamība un metabolisms. Tādēļ būtiski izprast ķīmiskās pārvērtības, kas notiek ar polifenoliem, tiem nonākot cilvēka organismā, lai pareizi izprastu bioloģisko iedarbību. Neskatoties uz pieaugošo pētījumu skaitu, polifenolu metabolisma ceļš cilvēkos vēl joprojām ir slikti izziņāts. Viens no galvenajiem trūkumiem ir ievērojamas biopieejamības atšķirības starp savienojumiem. Turklāt trūkst arī atsauces standartu, lai gan precīzi, gan kvantitatīvi noteiktu fenolsavienojumu metabolītus cilvēka organismā (Castello *et al.*, 2018). Iegūtie dati ir pamats,

lai spertu nākamos soļus un uzsāktu tālākas pārbaudes ar *in vivo* metodēm. Ņemot vērā atšķirīgo biopieejamību, būtu jāizskata katra *Vaccinium spp.* ekstrakta individuālie savienojumi un to savstarpējās mijiedarbības, lai sasniegtu visoptimālāko iznākumu.

Kopumā pētījuma rezultāti apstiprina, ka melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, purva dzērveņu un brūkleņu izspiedu ekstrakti inhibē enzīmu, 5-LOX, COX-1 un ksantīna oksidāzes, aktivitāti, apliecinot ekstraktu pretiekaisuma īpašības. Lai gan nepieciešami tālāki *in vivo* pētījumi, ekstraktiem ir veselību veicinošs potenciāls. Tos varētu izmantot, piemēram, funkcionālās pārtikas, kosmētikas un dažādu farmaceitisko produktu ražošanai, lai novērstu ar iekaisumu saistītas slimības.

SECINĀJUMI

1. *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstrakti no koncentrācijas atkarīgā veidā inhibēja 5-lipoksigenāzes enzimatisko aktivitāti. Visās pārbaudītajās koncentrācijās vispēcīgāko efektu uzrādīja lielogu dzērvenes ekstrakts, sasniedzot 76% inhibīciju koncentrācijā 1 mg/ml, bet visvājākais efekts novērots melleņu ekstraktam.
2. Visi ekstrakti 1mg/ml koncentrācijā uzrādīja statistiski ticamu COX-1 enzīma aktivitātes inhibīciju. Vislielākā inhibīcijas spēja konstatēta krūmmellenes ekstraktam (34%), bet vismazākā brūklenes ekstraktam (26%).
3. Ogu izspiedu ekstraktiem novēroja no koncentrācijas atkarīgu ksantīna oksidāzes aktivitātes inhibīciju. Vislielāko potenciālu (86% inhibīciju) uzrādīja mellenes ekstrakts 1 mg/ml koncentrācijā, bet visās koncentrācijās visvājāk ksantīna oksidāzes aktivitāti inhibēja lielogu dzērvenes ekstrakts.
4. Konstatēta stipra, pozitīva sakarība starp ekstraktu polifenolu un antocianīnu saturu un enzīmu inhibīciju. Polifenolu daudzums ekstraktos korelē ar 5-LOX aktivitātes inhibēšanas spēju, savukārt augstāks antocianīnu saturs korelē ar palielinātu inhibējošo efektu uz COX-1 un ksantīna oksidāzes aktivitāti.
5. Rezultāti apstiprina *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu pretiekaisuma īpašības *in vitro*, taču nepieciešami tālāki *in vivo* pētījumi.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājai profesorei Rutai Muceniecei par atsaucību, sniegtajiem padomiem, atbalstu un ieguldīto laiku.

Pateicos LU Ģeogrāfijas un Zemes zinātņu fakultātes pētniekiem par ogu izspiedu ekstraktu pagatavošanu.

Pateicos Mg. pharm. Reinim Rembergā par palīdzību darba praktiskajā izstrādē.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Aboonabi, A., Singh, I. and Rose' Meyer, R.** Cytoprotective effects of berry anthocyanins against induced oxidative stress and inflammation in primary human diabetic aortic endothelial cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 317:108940.
2. **Ackermann, M. R.** Inflammation and Healing. **In:** Zachary, J. F., editor. *Basis of Veterinary Disease*. 6th ed. Mosby; 2017. p. 73–131.
3. **Anhê, F. F., Roy, D., Pilon, G., Dudonné, S., Matamoros, S., Varin, T. V., Garofalo, C., Moine, Q., Desjardins, Y., Levy, E. and Marette, A.** A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015;64(6):872–883.
4. **Battelli, M. G., Bortolotti, M., Polito, L. and Bolognesi, A.** Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. *Redox Biology*. 2019;21:101070.
5. **Belkhiri, F., Baghiani, A., Zerroug, M. M. and Arrar, L.** Investigation of Antihemolytic, Xanthine Oxidase Inhibition, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Salvia Verbenaca* L. Aerial Part Extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. 2017;14(2):273–281.
6. **Breyer, M. D., Harris, R. C. and Breyer, R. M.** Eicosanoids and Renal Function. **In:** Alpern, R. J., Caplan, M. J., and Moe, O. W., editors. *Seldin and Geibisch's The Kidney*. Academic Press; 2013. p. 487–509.
7. **Bucić-Kojić, A., Fernandes, F., Silva, T., Planinić, M., Tišma, M., Šelo, G., Šibalić, D., Pereira, D. M. and Andrade, P. B.** Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by: *Trametes versicolor*. *Food and Function*. 2020
8. **Buczynski, M. W., Dumlao, D. S. and Dennis, E. A.** Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *Journal of lipid research*. 2009;50(6):1015–1038.
9. **Bujor, O.-C., Le Bourvellec, C., Volf, I., Popa, V. I. and Dufour, C.** Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2016;213: 58–68.
10. **Bujor, O.-C., Ginies, C., Popa, V. I. and Dufour, C.** Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. *Food Chemistry*. 2018;252:356–365.
11. **Bujor, O.-C., Tanase, C. and Popa, M. E.** Phenolic Antioxidants in Aerial Parts of

- Wild Vaccinium Species: Towards Pharmaceutical and Biological Properties. *Antioxidants*. 2019;8(12):649.
12. **Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. and Galán-Vidal, C. A.** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009;113(4):859–871.
 13. **Castello, F., Costabile, G., Bresciani, L., Tassotti, M., Naviglio, D., Luongo, D., Ciciola, P., Vitale, M., Vetrani, C., Galaverna, G., Brighenti, F., Giacco, R., Del Rio, D. and Mena, P.** Bioavailability and pharmacokinetic profile of grape pomace phenolic compounds in humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2018.
 14. **Cayman Chemical.** *Xanthine oxidase fluorometric assay kit*. [atsauce 29.04.2020.]
Pieejams: <https://www.caymanchem.com/pdfs/10010895.pdf>
 15. **Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X. and Zhao, L.** Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9(6):7204–7218.
 16. **Chu, W. K., Cheung, S. C. M. and Lau, R. A. W.** Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). **In:** Benzie, I. F. F. and Wachtel-Galor, S. editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects: Second Edition*. Boca Raton, FL:CRC Press; 2011. p. 55–67.
 17. **Das, Q., Lepp, D., Yin, X., Ross, K., McCallum, J. L., Warriner, K., Marccone, M. F. and Diarra, M. S.** Transcriptional profiling of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposed to ethanolic extract of organic cranberry pomace. *PLoS ONE*. 2019;14(7):e0219163.
 18. **DeFuria, J., Bennett, G., Strissel, K. J., Perfield, J. W., Milbury, P. E., Greenberg, A. S. and Obin, M. S.** Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae. *The Journal of Nutrition*. 2009;139(8):1510–1516.
 19. **Domitrovic, R.** The Molecular Basis for the Pharmacological Activity of Anthocyanins. *Current Medicinal Chemistry*. 2011;18(29):4454–4469.
 20. **Dorofejeva, K., Rakcejeva, T., Galoburda, R., Dukalska, L. and Kviesis, J.** Vitamin C content in Latvian cranberries dried in convective and microwave vacuum driers. *Procedia Food Science*. 2011;1:433–440.
 21. **Dorris, S. L. and Peebles Jr, R. S.** PGI₂ as a regulator of inflammatory diseases. *Mediators of inflammation*. 2012:926968.
 22. **Dreiseitel, A., Korte, G., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G. and Sand, P. G.** sPhospholipase A₂ is inhibited by anthocyanidins. *Journal of Neural Transmission*. 2009;116(9):1071–1077.

23. **Edirisinghe, I., Banaszewski, K., Cappozzo, J., McCarthy, D. and Burton-Freeman, B. M.** Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(16):8616–8624.
24. **Ermis, E., Hertel, C., Schneider, C., Carle, R., Stintzing, F. and Schmidt, H.** Characterization of in vitro antifungal activities of small and American cranberry (*Vaccinium oxycoccos* L. and *V. macrocarpon* Aiton) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) concentrates in sugar reduced fruit spreads. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;204:111–117.
25. **Fallah, A. A., Sarmast, E., Fatehi, P. and Jafari, T.** Impact of dietary anthocyanins on systemic and vascular inflammation: Systematic review and meta-analysis on randomised clinical trials. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;135:110922.
26. **Figueira, M. E., Oliveira, M., Direito, R., Rocha, J., Alves, P., Serra, A. T., Duarte, C., Bronze, R., Fernandes, A., Brites, D., Freitas, M., Fernandes, E. and Sepodes, B.** Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016;83: 1191–1202.
27. **Galvão, I., Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Machado, M. G. and Sousa, L. P.** Mediators of Inflammation. In Riccardi, C., Levi-Schaffer, F., and Tiligada, E., editors. *Immunopharmacology and inflammation*. Springer; 2018. p. 3–32.
28. **Giovanelli, G. and Buratti, S.** Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*. 2009;112(4):903–908.
29. **Glisan, S. L., Ryan, C., Neilson, A. P. and Lambert, J. D.** Cranberry extract attenuates hepatic inflammation in high-fat-fed obese mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016;37:60–66.
30. **Gupta, S. C., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, S. and Aggarwal, B. B.** Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases. *Frontiers in immunology*. 2018; 9:2160.
31. **Hanáková, Z., Hošek, J., Kutil, Z., Temml, V., Landa, P., Vaněk, T., Schuster, D., Dall’Acqua, S., Cvačka, J., Polanský, O. and Šmejkal, K.** Anti-inflammatory Activity of Natural Geranylated Flavonoids: Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitory Properties and Proteomic Analysis. *Journal of Natural Products*. 2017;80(4):999–1006.
32. **Hanna, V. S. and Hafez, E. A. A.** Synopsis of arachidonic acid metabolism: A

- review. *Journal of advanced research*. 2018;11:23–32.
33. **Jaismy, J. P., Manju, S. L., Ethiraj, K. R. and Elias, G.** Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;121:356–381.
 34. **Joo, M. and Sadikot, R. T.** PGD synthase and PGD2 in immune response. *Mediators of inflammation*. 2012:503128.
 35. **Joseph, S. V., Edirisinghe, I. and Burton-Freeman, B. M.** Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(18):3886–3903.
 36. **Jurikova, T., Skrovankova, S., Mlcek, J., Balla, S. and Snopek, L.** Bioactive compounds, antioxidant activity, and biological effects of European cranberry (*Vaccinium oxycoccos*). *Molecules*. 2019:24.
 37. **Karlsen, A., Paur, I., Böhn, S. K., Sakhi, A. K., Borge, G. I., Serafini, M., Erlund, I., Laake, P., Tonstad, S. and Blomhoff, R.** Bilberry juice modulates plasma concentration of NF- κ B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *European Journal of Nutrition*. 2010;49(6): 345–355.
 38. **Karppinen, K., Zoratti, L., Nguyenquynh, N., Häggman, H. and Jaakola, L.** On the developmental and environmental regulation of secondary metabolism in *Vaccinium* spp. Berries. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:655.
 39. **Latvijas Daba.** *Brūklene – Vaccinium vitis-idaea*. [atsauce 24.04.2020.] Pieejams: <https://www.latvijasdaba.lv/augi/vaccinium-vitis-idaea-l/>
 40. **Kawabata, K., Yoshioka, Y. and Terao, J.** Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. *Molecules*. 2019;24(370).
 41. **Kim, M. J., Ohn, J., Kim, J. H. and Kwak, H. K.** Effects of freeze-dried cranberry powder on serum lipids and inflammatory markers in lipopolysaccharide treated rats fed an atherogenic diet. *Nutrition Research and Practice*. 2011;5(5):404–411.
 42. **Kim, Y. H., Bang, C. Y., Won, E. K., Kim, J. P. and Choung, S. Y.** Antioxidant activities of *Vaccinium uliginosum* L. extract and its active components. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12(4):885–892.
 43. **Kim, Y. S., Young, M. R., Bobe, G., Colburn, N. H. and Milner, J. A.** ‘Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention’, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*. 2009;2(3):200–208.
 44. **Kivimäki, A. S., Ehlers, P. I., Siltari, A., Turpeinen, A. M., Vapaatalo, H. and Korpela, R.** Lingonberry, cranberry and blackcurrant juices affect mRNA expressions

- of inflammatory and atherothrombotic markers of SHR in a long-term treatment. *Journal of Functional Foods*. 2012;4(2):496–503.
45. **Kivimäki, A. S., Siltari, A., Ehlers, P. I., Korpela, R. and Vapaatalo, H.** Lingonberry juice lowers blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Functional Foods*. 2013;5(3):1432–1440.
46. **Kivimäki, A. S., Siltari, A., Ehlers, P. I., Korpela, R. and Vapaatalo, H.** Lingonberry juice negates the effects of a high salt diet on vascular function and low-grade inflammation. *Journal of Functional Foods*. 2014;7:238–245.
47. **Knaup, B., Oehme, A., Valotis, A. and Schreier, P.** Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009;53(5):617–624.
48. **Kolehmainen, M., Mykkänen, O., Kirjavainen, P. V., Leppänen, T., Moilanen, E., Adriaens, M., Laaksonen, D. E., Hallikainen, M., Puupponen-Pimiä, R., Pulkkinen, L., Mykkänen, H., Gylling, H., Poutanen, K. and Törrönen, R.** Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome. *Molecular nutrition & food research*. 2012;56:1501–1510.
49. **Kumar, V., Abbas, A. K. and Aster, J. C.** Robbins Basic Pathology. 10th ed. Elsevier; 2017. 952 p.
50. **Kunrade, L., Rembergs, R., Jēkabsons, K., Kļaviņš, L., Kļaviņš, M., Muceniece, R. and Riekstiņa, U.** Inhibition of NF- κ B pathway in LPS-stimulated THP-1 monocytes and COX-2 activity in vitro by berry pomace extracts from five *Vaccinium* species. *Journal of Berry Research*. 2020
51. **Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimiä, R., Westerlund-Wikström, B., Leppänen, T., Welling, J., Moilanen, E. and Heinonen, M.** Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European Cranberry (*Vaccinium microcarpon*) Proanthocyanidins: Isolation, Identification, and Bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(7):3373–3384.
52. **Laroze, L. E., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M. E. and Domínguez, H.** Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*. 2010;231(5):669–677.
53. **Lee, S., Keirse, K. I., Kirkland, R., Grunewald, Z. I., Fischer, J. G. and de La Serre, C. B.** Blueberry Supplementation Influences the Gut Microbiota, Inflammation, and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Rats. *The Journal of nutrition*. 2018;148(2):209–219.
54. **Legler, D. F., Bruckner, M., Uetz-von Allmen, E. and Krause, P.** Prostaglandin E2

- at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2010:198–201.
55. **Lim, T. K.** Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 2, Fruits. Springer. 2012. 1100 p.
 56. **Maleki, S. J., Crespo, J. F. and Cabanillas, B.** Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 2019;299:124124.
 57. **Manolescu, B. N., Oprea, E., Mititelu, M., Ruta, L. L. and Farcasanu, I. C.** Dietary Anthocyanins and Stroke: A Review of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies. *Nutrients*. 2019;11(7): 1479.
 58. **McCullough, M. L., Peterson, J. J., Patel, R., Jacques, P. F., Shah, R. and Dwyer, J. T.** Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;95:454–464.
 59. **McDougall, G. J., Ross, H. A., Ikeji, M. and Stewart, D.** Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(9):3016–3023.
 60. **Megantara, S., Agung Yodha, M. W., Sahidin, I., Diantini, A. and Levita, J.** Pharmacophore screening and molecular docking of phytoconstituents in polygonum sagittatum for cyclooxygenase-2 inhibitors discovery. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(1):83–88.
 61. **Milne, G. L., Yin, H., Hardy, K. D., Davies, S. S. and Roberts 2nd, L. J.** Isoprostane generation and function. *Chemical reviews*. 2011;111(10):5973–5996.
 62. **Muceniece, R., Klavins, L., Kvisis, J., Jekabsons, K., Rembergs, R., Saleniece, K., Dzirkale, Z., Saulite, L., Riekstina, U. and Klavins, M.** Antioxidative, hypoglycaemic and hepatoprotective properties of five Vaccinium spp. berry pomace extracts. *Journal of Berry Research*. 2019;9:267–282.
 63. **Narwojsz, A., Tańska, M., Mazur, B. and Borowska, E. J.** Fruit Physical Features, Phenolic Compounds Profile and Inhibition Activities of Cranberry Cultivars (Vaccinium macrocarpon) Compared to Wild-Grown Cranberry (Vaccinium oxycoccus). *Plant Foods for Human Nutrition*. 2019;74(3):300–306.
 64. **Nguyen, M. T., Awale, S., Tezuka, Y., Ueda, J., Tran, Q. le and Kadota, S.** Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of Chrysanthemum sinense. *Planta medica*. 2006;72(1):46–51.
 65. **Nile, S. H., Ko, E. Y., Kim, D. H. and Keum, Y.-S.** Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016;26(1):50–55.

66. **Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D. C. and Liao, J. K.** Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285(5431):1276–1279.
67. **Pandey, K. B. and Rizvi, S. I.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009;2(5):270–278.
68. **Pérez-Cano, F. J. and Castell, M.** Flavonoids, inflammation and immune system. *Nutrients*. 2016;8:659.
69. **Piotrowski, I., Kulcenty, K. and Suchorska, W.** Interplay between inflammation and cancer. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 2020;25(3):422–427.
70. **Popov, S. V, Markov, P. A., Nikitina, I.-R., Petrishev, S., Smirnov, V. and Ovodov, Y. S.** Preventive effect of a pectic polysaccharide of the common cranberry *Vaccinium oxycoccos* L. on acetic acid-induced colitis in mice. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(41):6646–6651.
71. **Powell, W. S. and Rokach, J.** Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015;1851(4):340–355.
72. **Reißner, A. M., Al-Hamimi, S., Quiles, A., Schmidt, C., Struck, S., Hernando, I., Turner, C. and Rohm, H.** Composition and physicochemical properties of dried berry pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(3):284–1293.
73. **Riihinen, K. R., Ou, Z. M., Gödecke, T., Lankin, D. C., Pauli, G. F. and Wu, C. D.** The antibiofilm activity of lingonberry flavonoids against oral pathogens is a case connected to residual complexity. *Fitoterapia*. 2014;97:78–86.
74. **Rouzer, C. A. and Marnett, L. J.** Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of lipid research*. 2009;50:29–34.
75. **Rózańska, D. and Regulska-Ilow, B.** The significance of anthocyanins in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2018;27(1):135–142.
76. **Sala, A., Proschak, E., Steinhilber, D. and Rovati, G. E.** Two-pronged approach to anti-inflammatory therapy through the modulation of the arachidonic acid cascade. *Biochemical Pharmacology*. 2018;158:61–173.
77. **Schmidt, H. M., Kelley, E. E. and Straub, A. C.** The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biology*. 2019;21:101072.
78. **Shi, D., Xu, M., Ren, M., Pan, E., Luo, C., Zhang, W. and Tang, Q.** Immunomodulatory Effect of Flavonoids of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)

- Leaves via the NF- κ B Signal Pathway in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Journal of Immunology Research*. 2017.
79. **Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T. and Sochor, J.** Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(10):24673–24706.
 80. **Smith, W. L., Dewitt, D. L. and Garavito, R. M.** Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*. 2000;69:45–182.
 81. **Stephenson, T. J.** Inflammation. In: Cross, S. S., editor. *Underwood's Pathology: A Clinical Approach*. Elsevier; 2013. p. 776.
 82. **Struck, S., Plaza, M., Turner, C. and Rohm, H.** Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science and Technology*. 2016;51(6):1305–1318.
 83. **Su, Z.** Anthocyanins and Flavonoids of Vaccinium L.. *Pharmaceutical Crops*. 2012;3:7–37.
 84. **Szymanowska, U. and Baraniak, B.** Antioxidant and potentially anti-inflammatory activity of anthocyanin fractions from pomace obtained from enzymatically treated raspberries. *Antioxidants*. 2019;8:299.
 85. **Vendrame, S. and Klimis-Zacas, D.** Anti-inflammatory effect of anthocyanins via modulation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Nutrition Reviews*. 2015;73(6):348–358.
 86. **Wang, T., Fu, X., Chen, Q., Patra, J. K., Wang, D., Wang, Z. and Gai, Z.** Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *International journal of molecular sciences*, 2019;20(15):3683.
 87. **Weinberger, B., Hirsch, D., Yin, K. and Spur, B. W.** Lipid Mediators and Lung Function. In: Parent, R., editor. *Comparative Biology of the Normal Lung*. Academic Press; 2015. p. 834.
 88. **Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M. and Matar, C.** The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 2018;10:1618.
 89. **Zagayko, A. L., Kolisnyk, T. Y., Chumak, O. I., Ruban, O. A. and Koshovyi, O. M.** Evaluation of anti-obesity and lipid-lowering properties of Vaccinium myrtillus leaves powder extract in a hamster model. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2018;29(6):697–703.
 90. **Zhang, Z. C., Wang, H. Bin, Zhou, Q., Hu, B., Wen, J. H. and Zhang, J. L.** Screening of effective xanthine oxidase inhibitors in dietary anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Cultivar Eshu No.8) and deciphering of the

underlying mechanisms in vitro. *Journal of Functional Foods*. 2017;36:102–111.

91. **Zhao, J., Huang, L., Sun, C., Zhao, D. and Tang, H.** Studies on the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and xanthine oxidase through enzyme kinetics, spectroscopy methods and molecular simulations. *Food Chemistry*. 2020;323:126807.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs “*Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu pretiekaisuma īpašības” 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: Marta Silavniece _____
(paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: prof. Dr. habil. biol. Ruta Muceniece _____
(paraksts) (datums)

Recenzents: pasniedzēja, Mg.sc.sal. Ilona Vanaga _____
(paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē 12.05.2020.

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2020., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: docente Kristīne Saleniece, dr.pharm. _____
(paraksts)