

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

**MELLEŅU ĢINTS OGU SPIEDPALIEKU EKSTRAKTU
IETEKME UZ DZILĀS GLIKĒŠANAS GALA PRODUKTU
VIEDOŠANOS UN BETA AMILOĪDPROTEĪNA
AGREGĀCIJU *IN VITRO***

BAKALaura DARBS

Autors: **Pāvels Filatovs**

Studenta apliecības Nr.: pf17006

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

RĪGA 2020

ANOTĀCIJA

Bakalaura darbā tika pētīta *Vaccinium* ģints piecu ogu izspaidu ekstraktu spēja inhibēt avancēto glikēšanas gala produktu (AGE) un Abeta proteīna 1-42 agregātu veidošanos *in vitro*. Ekstraktu efektus pētījām uz AGE veidošanos seruma albumīna un metilglioksāla reakcijā un uz Abeta 1-42 spontāno agregāciju paaugstinātā temperatūrā un reakcijā ar metilglioksālu. Iegūtie rezultāti parāda, ka pētītie ogu ekstrakti inhibē AGE un Abeta 1-42 agregātu veidošanos. Melleņu ekstrakts efektīvāk par citiem ekstraktiem inhibēja AGE veidošanos, salīdzinot ar kontroli, bet Abeta 1-42 agregāciju visefektīvāk inhibēja lielogu dzērveņu un purva dzērveņu ogu izspaidu ekstrakti.

Šī pētījuma rezultāti liecina, ka melleņu ģints ogu izspaidu ekstraktiem ir spējas inhibēt AGE un Abeta 1-42 agregātu veidošanos *in vitro*.

Atslēgas vārdi: AGE, *Vaccinium* ģints ogu ekstrakti, Abeta1-42 agregācija, *in vitro* metodes

SUMMARY

The aim of the bachelor's thesis was to investigate the ability of five berry pomace extracts of the genus *Vaccinium* to inhibit the formation of advanced glycation end products (AGE) and Abeta protein 1-42 aggregates *in vitro*. The effects of the extracts were studied on the formation of AGE in the reaction of serum albumin and methylglyoxal and on the spontaneous aggregation of Abeta 1-42 at elevated temperature and in the reaction with methylglyoxal. The obtained results show that the studied berry extracts inhibit the formation of AGE and Abeta 1-42 aggregates. Blueberry extract was more effective than other extracts in inhibiting AGE formation compared to controls, but Abeta 1-42 aggregation was most effectively inhibited by large cranberry and bog cranberry berry pomace extracts. The results of this study show that blueberry berry pomace extracts have the ability to inhibit the formation of AGE and Abeta 1-42 aggregates *in vitro*.

Keywords: AGE, *Vaccinium* berry extracts, Abeta1-42 aggregation, *in vitro* methods

SATURS

IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Advancētie glikēšanas gala produkti	8
1.2. Eksogēnie un endogēnie AGE	8
1.3. AGE loma slimību veidošanās procesos	9
1.4. Amiloīd beta proteīns 1-42	9
1.5. Polifenoli	10
1.6. Pārejas metālu jonu helāti un polifenoli	11
1.7. Dikarbonilgrupas	12
1.8. Polifenoli un amiloīd beta proteīns	12
1.9. Antocianīni	13
1.10. <i>Vaccinium</i> ģints	14
1.11. Ogu izspaidas	14
1.12. Ogu izspaidu saturs	15
2. MATERIĀLI un METODEDES	17
2.1. Materiāli	17
2.1.1 Reāģenti, palīgvielas un materiāli	17
2.1.2. Aparatūra	18
2.2. Metodes	18
2.2.1. AGE veidošanās liellopu seruma albumīna un metilglioksāla reakcijā	18
2.2.2. Abeta 1-42 agregātu ar MGO veidošanās metode	19
2.2.3. Abeta 1-42 agregātu veidošanās paaugstinātā temperatūrā	20
Datu statistiskā analīze	20
3. REZULTĀTI	21
3.1. Ogu izspaidu ekstraktu AGE veidošanās inhibīcija <i>in vitro</i>	21
3.2. Ogu ekstraktu Abeta 1-42 un MGO agregātu veidošanās inhibīcija	23
3.3. Ogu ekstraktu Abeta 1-42 agregātu spontāna veidošanās paaugstinātā temperatūrā	24
4. DISKUSIJA	28
5. SECINĀJUMI	31
6. PATEICĪBAS	32
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	33
DOKUMENTĀRĀ LAPA	36

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AGE	Advancētie glikēšanas gala produkti
BSA	Liellopu seruma albumīns
DMSO	Dimetilsulfoksīds
EGCG	Epigallokatehīna gallāts
GO	Glioksāls
MGO	Metilglioksāls
RAGE	Advancēto glikēšanas gala produktu receptors
RFU	Relatīvās fluorescences vienības
SD	Standarta novirze

IEVADS

Pagājušajā gadsimtā ir ievērojami pieaudzis cilvēku dzīves ilgums. Bet līdz ar to ir novērots ar vecumu saistītu slimību pieaugums. Neurodeģeneratīvās slimības ir vienas no tām, un to izplatību veicina veiksmīgas terapijas trūkums. Neurodeģeneratīvi traucējumi ietver Alzheimeru slimību (AD), Parkinsona slimību (PD), amiotrofo laterālo sklerozi (ALS) un prionu slimību, kurai raksturīgs pakāpeniski progresējošs nervu audu zudums un nepareizi salocītu vai proteīnu agregātu uzkrāšanās (Li *et al.*, 2012).

Arvien vairāk pierādījumu liecina, ka oksidatīvajam stresam ir liela nozīme neurodeģeneratīvo slimību patoģenēzē (Calabrese *et al.*, 2010). Lielā skābekļa patēriņa, glikozes metabolisma, redoksi aktīvā dzelzs līmeņa paaugstinājuma dēļ smadzenes ir īpaši neaizsargātas pret oksidējošu kaitējumu. Turklāt tiek uzskatīts, ka smadzenes satur salīdzinoši maz tādu antioksidantu kā glutations un E vitamīns, kā arī aizsargājošo enzīmu, piemēram, glutaciona peroksidāzes, katalāzes un superoksīda dismutāzes ekspresija ir zema. Visi šie faktori veicina augstu oksidatīvā stresa risku smadzenēs (Li *et al.*, 2012). Glikēšanas gala produktu (*advanced glycation end products* (AGE)) veidošanās ir gan oksidatīvo stresu izraisošs faktors, gan stresa rezultāts. AGE rodas, ja proteīni tiek modificēti bez enzīmu iesaistīšanās – glikēti un oksidēti pēc saskares ar aldozēm. Sākotnēji veidojas kovalentās saites starp aminoskābju brīvajām aminogrupām, piemēram, lizīna, arginīna vai proteīnu terminālo aminoskābju aminogrupu un cukuriem, piemēram, glikozi, fruktozi, ribozi u.c. Reakciju starpprodukti ir Šifa bāze, Amadori un Mailarda produkti. Vislabāk zināmie Amadori produkti ir HbA1c (glikētais hemoglobīns) un fruktozamīns (fruktozilizīns). Neenzimātiska proteīnu glikozilēšana ir brīvo karbonilgrupu pievienošana proteīnu, aminoskābju, lipoproteīnu un nukleīnskābju brīvajām aminogrupām. Tā rezultātā veidojas agrīni glikācijas produkti. Agrīnie glikācijas produkti ir pazīstami kā Mailarda reakcijas produkti. Šajā reakcijā molekulām notiek dehidratācija, ciklizācija un pārkārtošanās, lai veidotu AGE. Kopumā pētnieki ir noskaidrojuši, ka AGE ir atbildīgi par lielāko daļu metabolisma traucējumu, ieskaitot cukura diabētu, vēzi, neiroloģiskiem traucējumiem un novecošanos. AGE uzkrāšanās neurodeģeneratīvajos audos parāda tā iesaistīšanos slimību patoģijā (Ahmad *et al.*, 2016). Tomēr dati ir pretrunīgi par AGE iesaistīšanos amiloīda beta proteīna (Abeta) agregācijā. Vieni autori uzskata, ka AGE primāri veicina Abeta fibrilu veidošanos, bet citi, ka AGE un Abeta agregātu atrašana Abeta plāksnēs ir sekundāra (Ahmad *et al.*, 2016). Līdz šim nav izdevies atrast sintētisku AGE veidošanās inhibitoru, kuram klīnikā nebūtu nevēlamu blakus efektu. Tāpēc meklē AGE inhibitorus starp dabas vielām, un ir atrasts, ka fenolsavienojumi, flavonoīdi, izoflavoni, antociānīni, karotenoīdi, terpēni un nepiesātinātās taukskābes samazina proteīnu glikēšanu (Ahmad *et al.*,

2016; Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015). Ogu sulas iegūšanas procesā apmēram 30% no ogu svara pāri paliek izspaidas (Struck *et al.*, 2016). Izspaidas ekstrahējot var iegūt ar polifenoliem vai citām bioloģiski aktīvām vielām bagātas frakcijas, kuru saturs var atšķirties no ogu ekstraktu bioloģiski aktīvo vielu satura. Izspaidu ekstraktu efekti uz AGE veidošanos un Abeta agregāciju ir maz pētīti.

Hipotēze: Melleņu ģints ogu izspiedu ekstrakti inhibē glikēšanas gala produktu veidošanos un amiloīdproteīna fragmenta 1-42 agregāciju *in vitro*.

Darba mērķis:

Pētīt melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu izspiedu ekstraktu ietekmi uz AGE un Abeta 1-42 agregātu veidošanos.

Darba uzdevumi:

- Pētīt piecu *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu ietekmi uz AGE veidošanos liellopu seruma albumīna un metilglioksāla reakcijā *in vitro*.
- Noskaidrot melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu izspiedu ekstraktu efektus uz Abeta 1-42 agregātu veidošanos metilglioksāla klātbūtnē.
- Pētīt piecu *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstraktu ietekmi uz Abeta 1-42 agregātu veidošanos 37⁰ Celsija grādu temperatūrā (termo agregācija).
- Salīdzināt ogu izspiedu ekstraktu AGE un Abeta 1-42 agregātu veidošanās inhibīcijas efektivitāti ar atsauces vielām - sintētisko AGE inhibitoru aminoguanidīnu un polifenolu resveratrolu.

Bakalaura darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē Zinātņu mājas zinātniskajā laboratorijā Dr. habil. biol. Rutas Mucenieces vadībā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Advancētie glikēšanas gala produkti

Glikācija ir neenzimātiska reakcija starp reducējošiem cukuriem, piemēram, glikozi un proteīniem, lipīdiem vai nukleīnskābēm. Glikācija ir jānošķir no glikozilēšanas, kas ir fermentatīva reakcija. Šo reakciju pirmo reizi aprakstīja franču zinātnieks Luis Kamils Maillard 1912.gadā (Gkogkolou, 2012). Luis Kamils Maillards pirmoreiz paziņoja par to, ka reducējošie cukuri reaģē ar aminoskābēm šķīdumā un veidojas tumšas krāsas produkti (melanoidīni), līdzīgas reakcijas var notikt šķīdumos ar reducējošiem cukuriem un peptīdiem vai proteīniem (Sadowska-Bartosz, 2015).

Advancēto glikēšanas gala produktu (AGE) veidošanās ir sarežģīts molekulārs process, kas ietver sevī vienkāršas un sarežģītākas daudzpakāpju reakcijas. Šie produkti veidojas no stundas līdz dienām, atkarībā no proteīnu dzīves ilguma (Omolaoye, 2020). Klasiskās Maillarda reakcijas laikā – reducējošie cukuri neenzimātiski pievienojas proteīniem, kas veido nestabilu Šifa bāzi (Bansode, 2019. Gkogkolou, 2012). Tālāk šīs Šifa bāzes tiek pārkārtotas, tādējādi nodrošinot lielākoties stabilus ketoamīnus (Amadori produktus). Šifa bāzes un Amadori produkti ir atgriezeniskas reakcijas produkti, tomēr tie var neatgriezeniski reaģēt ar peptīdu vai proteīnu atlikumiem, veidojot proteīnu adduktus (*adducts*) vai proteīnu krusteniskās saites (*crosslinks*). Alternatīvi tie var tikt pakļauti tālākai oksidēšanai, dehidratācijai, polimerizācijai un oksidatīvai sadalīšanai, lai izveidotu citus AGE (Bansode, 2019. Gkogkolou, 2012).

Kamēr notiek Šifa bāzu un Amadori produktu pārkārtošanās, veidojas dažas ļoti reaģējošas molekulas, kuras sauc par α -dikarbonil savienojumiem, glioksāls (GO), metilglioksāls (MGO) un 2-dezoksiglikozons (3-DG). Šie savienojumi tiek uzskatīti par AGE prekursoriem, jo tie var oksidēties vai neoksidatīvi noārdoties veidot AGE (Omolaoye, 2020).

1.2. Eksogēnie un endogēnie AGE

Advancētie glikēšanas gala produkti var rasties *in vivo* normālu vielmaiņas procesu rezultātā vai arī tos var uzņemt ar uzturu. Metilglioksāls (MGO) ir visizplatītākais AGE sintēzes endogēnais mediators, kas ir sastopams visās šūnās. MGO galvenokārt rodas ogļhidrātu, lipīdu vai aminoskābju metabolisma rezultātā, iesaistot gan fermentatīvas, gan neenzimātiskas reakcijas. MGO sintēzi katalizē metilglioksāla sintāze, citohroms P450 2E1, mieloperoksidāze un acetons. MGO sintēzes neenzimātiskie ceļi ietver dihidroksiacetona fosfāta spontānu sadalīšanos, Maillarda reakciju, aceola oksidāciju un lipīdu peroksidāciju. Eksogēnie AGE lielākoties tiek uzņemti ar pārtiku, ko mēs patērējam. Tomēr ir grūti novērtēt endogēno un

eksogēno AGE līdzsvaru, jo tas ir saistīts ar AGE molekulu daudzveidību, to atšķirīgo biopotenciālu un ticamu datu trūkumu par to metabolismu, absorbciju un sadalījumu ķermenī (Prasad, *et.al.*, 2017).

1.3. AGE loma slimību veidošanās procesos

Koronāro artēriju slimība joprojām ir galvenais mirstības iemesls pieaugušiem cukura diabēta pacientiem, tomēr ir arī daudz sirds pacientu bez cukura diabēta slimības. Meklējot kopējus molekulāros mehānismus un metabolisma blakusproduktus ar potenciālo patogēno lomu, avancētie glikēšanas gala produktus abos gadījumos ir kritisks biomarkieris koronāro artēriju slimības attīstībai. AGE mijiedarbība ar to transmembranālo šūnu receptoru RAGE, kuru ekspresija notiek endotēlijā un gludās muskulatūras šūnās, kā arī trombocītos, aktivizē intracelulāro signalizāciju, kas noved pie endotēlija bojājumiem, asinsvadu gludo muskuļu šūnu funkcijas zaudējuma un izmaina trombocītu aktivitāti. Turklāt AGE uzkrāšanās audos ietekmē pašreizējās ārstēšanas metodes, kas saistītas ar stenta restenozi (Kosmopoulos, *et.al.*, 2019).

Ar vecumu saistītie neurodeģeneratīvie traucējumi, piemēram, Alcheimera, Parkinsona un Hantingtona slimības, raksturo patoloģiska proteīnu uzkrāšanās vai agregācija. AGE ir proteīni vai lipīdi, kas glikējas pēc saskarsmes ar cukuriem. AGE veidošanās veicina proteīnu nogulsnešanos, pateicoties proteāžu izturīgai krusteniskai saiknei starp peptīdiem un proteīniem. Vairāki proteīni, kas saistīti ar neurodeģeneratīvām slimībām, piemēram, β amiloīds, tau, α -sinukleīns un prioni, tiek glikēti, un glikācijas pakāpe ir saistīta ar pacientu patoloģijām. Šie dati liecina, ka AGE veicina neurodeģeneratīvo slimību attīstību (Li, *et.al.*, 2012).

Neskatoties uz jaunām un efektīvām zāļu terapijām, rezistence pret insulīnu, 2.tipa cukura diabēts un tā komplikācijas joprojām ir galvenās medicīniskās problēmas. Ir pieņemts, ka insulīna rezistence, kas bieži saistīta ar pārmērīgu uzturu un aptaukošanos, rodas hroniski paaugstināta oksidatīvā stresa un hroniska iekaisuma rezultātā. Mazāk atzīts, ka galvenais šī iekaisuma cēlonis ir pārmērīga AGE uzņemšana ar uzturu (Vlassara, 2013).

1.4. Amiloīd beta proteīns 1-42

Alcheimera slimības laikā smadzeņu šūnas, kas apstrādā, glabā un iegūst informāciju, deģenerējas un mirst. Lai arī zinātnieki vēl nezina šīs iznīcināšanas pamatcēloņus, viņi ir identificējuši vairākus iespējamus "vainīgos" (Beta-amyloid and the amyloid hypothesis, 2017).

Viens no galvenajiem aizdomās turētajiem ir mikroskopisks smadzeņu proteīna fragments, ko sauc par beta-amiloīdu, kas ir “lipīgs” savienojums un uzkrājas smadzenēs, izjaucot saziņu starp smadzeņu šūnām un galu galā tās nogalinot. Daži pētnieki uzskata, ka Alzheimer slimības galvenais cēlonis ir procesi, kas regulē beta-amiloīda ražošanu, uzkrāšanos un šūnu iznīcināšanu. Šo teoriju sauc par “amiloīdo hipotēzi” (Beta-amyloid and the amyloid hypothesis, 2017).

Lai arī agrīnie pētījumi liecināja, ka amiloīdu plāksnes – lielas beta-amiloīdu molekulu uzkrāšanās – ir Alzheimer slimības laikā nervu šūnu toksicitātes iemesls, pētnieki tagad uzskata, ka mazie, šķīstošie beta-amiloīdu agregāti var būt toksiskāki (Beta-amyloid and the amyloid hypothesis, 2017).

Kāpēc tieši beta-amiloīds ir galvenais aizdomās turētais proteīns, kas norāda uz Alzheimer slimību? Beta-amiloīds ir ķīmiski “lipīgāks” nekā citi fragmenti, kas tiek ražoti, kad amiloīda prekursora proteīns (APP) tiek sadalīts. Tas pakāpeniski uzkrājas mikroskopiskās amiloīdās plāksnēs, kuras tiek uzskatītas par Alzheimer skarto smadzeņu pazīmi. Fragmenti vispirms veido mazas kopas, ko sauc par oligomēriem, pēc tam veidojas fibrillas, kam seko fibrillu paklāji, ko sauc par *beta sheets*. Pēdējais posms ir plāksnes, kurās ir saliktas *beta sheets* un citas vielas (Beta-amyloid and the amyloid hypothesis, 2017).

1.5. Polifenoli

Polifenoli ir augu sekundārie metabolīti un parasti ir iesaistīti aizsardzībā pret ultravioleto starojumu vai patogēnu agresiju. Tie galvenokārt atrodami augļos, dārzeņos, graudaugos un dzērienos. Pārtikā polifenoli var uzlabot rūgtumu, krāsu, garšu, smaržu un oksidēšanās spējas (González, *et.al.*, 2020).

Šī ļoti neviendabīgā savienojumu grupa ir piesaistījusi visas pasaules zinātnieku aprindu uzmanību, ņemot vērā to iespējamo labvēlīgo ietekmi uz cilvēka veselību. Polifenolus parasti iedala piecās dažādās grupās, ieskaitot, flavonoīdus, fenolskābes, fenola spirtus, stilbēnus un lignānus. Flavonoīdus sīkāk sadala flavonos, flavanonos, flavonolos, flavanolos un izoflavonos. Fenolskābes var iedalīt hidroksibenzoskābes un hidroksikanēļskābes atvasinājumos (González, *et.al.*, 2020).

Jāatzīmē, ka polifenoli spēj mazināt glikācijas kaitīgās sekas, izmantojot dažādus mehānismus, galvenokārt ar ROS veidošanās kavēšanu glikācijas laikā, ar Šifa bāzes vai Amadori produktu kavēšanu un sekojošu dikarbonilgrupu veidošanu. Polifenoli spēj aktivizēt detoksikāciju, jo īpaši caur glikoksalāzes sistēmu, kā arī bloķējot AGE-RAGE mijiedarbību (González, *et.al.*, 2020).

Ir plaši atzīts, ka Maillarda reakcijas agrīno stadiju pavada liels daudzums brīvo radikāļu. Turklāt Šifa bāzes arī tiek pakļautas oksidācijai, un tā rezultātā rodas brīvie radikāļi un reaktīvās karbonilgrupas. Tiek domāts, ka agrīnās glikācijas stadijās samazināta brīvo radikāļu, karbonil- un dikarbonilgrupu veidošanās var kavēt glikācijas funkciju (González, *et.al.*, 2020).

Pārliecinošs pierādījumu kopums liecina, ka proteīnu glikācijas kavēšana ar polifenoliem balstās uz to antioksidantu īpašībām. Faktiski, antiglikācijas aktivitāte stingri korelē ar brīvo radikāļu elimināciju un polifenolu saturu (González, *et.al.*, 2020).

Polifenoli ir spēcīgi antioksidanti, kas var ne tikai neitralizēt brīvos radikāļus, bet arī nomāc brīvo radikāļu veidošanos, tādējādi samazinot oksidācijas ātrumu. Biežāk tie darbojas kā tiešie radikāļu lipīdu peroksidācijas ķēdes reakcijas pārtraucēji. Ķēdes pārtraucēji ziedo elektronu brīvajiem radikāļiem, neitralizējot radikāļus paši kļūst par stabiliem (mazāk reaktīviem) radikāļiem, tādējādi pārtraucot ķēdes reakcijas [González, *et.al.*, 2020].

Ir ziņots, ka daudzi polifenoli, piemēram, katehīni, proantociānīdīni, antociānīni un flavanoli kavē advancēto glikēšanas gala produktu veidošanos (González, *et.al.*, 2020).

1.6. Pārejas metālu jonu helāti un polifenoli

Par oksidācijas reakciju lomu olbaltumvielu izraisītajās modifikācijās tiek domāts jau kopš 80. gadu beigām. Jāatzīmē, ka hiperglikēmiskos apstākļos pārejas metāli skābekļa klātbūtnē katalizē glikozes autooksidāciju vai lipīdu peroksidāciju (González, *et.al.*, 2020).

Dzelzs un vara homeostāzes izmaiņas ir diabēta pazīmes, par ko liecina dzelzs un vara nogulsnešanās sirdī, nierēs un citos audos. Jāatzīmē, ka ar polifenoliem bagātināts ekstrakts no gvajaves lapām, izmantojot helātu veidošanos mehānismu, no devas atkarīgā veidā kavēja Amadori produktu veidošanos (González, *et.al.*, 2020).

Hlorogēnskābes pārstāv bagātīgu augu polifenolu grupu, kas plaši sastopama cilvēka uzturā, šī skābe arī kavē advancēto glikēšanas gala produktu veidošanos ar metālu helātu palīdzību (González, *et.al.*, 2020).

Rutinam, citrusaugļu flavonoīdam, piemīt helātu veidošanās stimulēšanas īpašības un tas samazina Fentona reakciju kā brīvo radikāļu veidošanās avotu. Tiek ziņots, ka kafijskābe saistās ar dzelzs joniem un novērš Fentona reakcijas oksidatīvās sekas, tai skaitā lipīdu peroksidāciju, DMPO hidroksilēšanu un 2-dezoksiribozoksidējošo noārdīšanos (González, *et.al.*, 2020).

Šie atklājumi ir pelnījuši īpašu uzmanību, ņemot vērā, ka hēma proteīnu glikācija efektīvi atbrīvo brīvo dzelzi no hēma grupas, kas savukārt var katalizēt *Haber-Weiss* reakciju, radot

brīvos radikāļus, īpaši hidroksil (-OH) radikāļus un tādējādi palielinot oksidatīvo stresu. Lai arī daudzi polifenoli ietekmē metāla jonu helātu veidošanos, tieši šajā bioloģiskajā darbībā tie parāda būtiskas atšķirības atkarībā no to molekulārās struktūras (González, *et.al.*, 2020).

Vienā nesēnā pētījumā, kurā salīdzināja 10 polifenolu helātu veidošanas spējas, pētnieki izteica pieņēmumu, ka katehola daļa, kas atrodas daudzās polifenoliskajās struktūrās, ir būtiska funkcionālā grupa metālu helātu veidošanā (González, *et.al.*, 2020).

1.7. Dikarbonilgrupas

Kā jau iepriekš tika minēts, vai nu Šifa bāzu sadrumstalotība (*Namiki* ceļš), Amadori produktu autoksidācija (*Hodge* ceļš), heksozes autooksidācija (*Wolff* ceļš) vai glikolītiskā vai poliola ceļa blakusprodukti var radīt jaunus reaktīvus dikarbonilu starpproduktus, piemēram, metilglioksālu (MGO) un glioksālu (GO). Pēc tam šie dikarbonili var modificēt proteīnus, veidojot dažādu ķīmisko struktūru avancētos glikēšanas gala produktus (González, *et.al.*, 2020).

Reaktīvo dikarbonilproduktu, kas pazīstams arī kā “karbonilstress”, palielināšanās ir diabēta hiperglikēmijas sekas. Šajā kontekstā ir ziņots par dažu polifenolu dikarbonilsavienojumu notveršanas spēju. Tas attiecas uz (-) – epigallokatehīna – 3 – gallātu (EGCG), galveno bioaktīvo zaļās tējas polifenolu, kas var efektīvi notvert reaktīvos dikarbonilsavienojumus (MGO vai GO). Tādi pat efekti ir novēroti resveratrolam, kvercetīnam, (+) – katehīnam, (-) – epikatehīnam, hlorogēnskābei un [6] -gingerolam (González, *et.al.*, 2020).

Turklāt procianidīni, kas plaši sastopami dažādu ogu sugās (mellenēs, kazenēs, zemenēs, avenēs, dzērvenēs), kā arī senās magnolijas ģints ziedos, novērš avancēto glikēšanas gala produktu veidošanos (González, *et.al.*, 2020).

1.8. Polifenoli un amiloīd beta proteīns

Plašajam peptīdu un proteīnu klāstam piemīt unikāla tieksme pašsavienoties nešķīstošās fibrilārajās ceturctējās struktūrās. Nepareizi salocīti proteīni ir īpaši pakļauti agregācijai. Tagad ir zināmi aptuveni 50 traucējumi, kas saistīti ar normāli šķīstošu, funkcionālu peptīdu un proteīnu nepareizu salocīšanu un to turpmāku pārveidošanu, un intracelulāru un ārpusšūnu amiloīdu agregātu (fibrillu) veidošanos. Amiloīdu vai amiloīdu kompleksu samazināšana, iespējams, ir visefektīvākā terapeitiskā pieeja ar amiloīdiem saistītu slimību ārstēšanā (Siposova, *et.al.*, 2019).

Lai arī ir pieliktas lielas pūles, lai izprastu šo slimību patoģenēzi un izveidotu efektīvu terapiju, joprojām nav iespējams pilnīgi izārstēt šīs slimības. Daudzām molekulām tika

pārbaudīta to spēja traucēt proteīnu amiloīdu agregāciju. Piemēram, vairākos ziņojumos ir parādīta mazu molekulu efektivitāte, lai kavētu vai palēninātu amiloīda veidošanos. Šajā aktīvo savienojumu grupā ietilpst īsie peptīdi, hinonu atvasinājumi, polifenoli un citas molekulas (Siposova, *et.al.*, 2019).

Pēdējās desmitgadēs ir palielinājusies interese par dabā sastopamajiem savienojumiem un to terapeitisko potenciālu. Jo īpaši polifenoliskajiem savienojumiem ir zināmas labvēlīgas farmakoloģiskās aktivitātes, piemēram, antioksidatīva, -pretiekaisuma, -antivirāla vai pretalerģiska iedarbība, un tie var mazināt metālu izraisītu toksisku iedarbību (Siposova, *et.al.*, 2019).

Turklāt daudzu pētījumu rezultāti, šķiet, norāda uz to, ka daži polifenoli var sniegt neiroprotektīvu iedarbību, izmantojot vairākus farmakoloģiskos ceļus. Tomēr tiek uzskatīts, ka to primāro neiroprotektīvo iedarbību var gūt no amiloīdo fibrilu veidošanās kavējošās iedarbības (Siposova, *et.al.*, 2019).

Vispētītākie augu polifenoli ar daudzsološu anti-amiloīdo aktivitāti ir tējas katehīni, (-) - epigallokatehīna-3-galāts (EGCG), ar vīnu saistītie polifenoli – kvercetinā atvasinājumi un stilbēni, resveratrols, tanīnskābe, kā arī kurkumīns. Diemžēl, kā dokumentēts daudzos pētījumos, kurkumīna perorālā biopieejamība ir zema sakarā ar salīdzinoši zemu absorbciju zarnās un ātru metabolismu aknās, kam seko eliminācija caur žultspūsli (Siposova, *et.al.*, 2019).

Daudzi dabiski sastopami savienojumi ir pētīti kā potenciāla terapija, lai palēninātu vai novērstu Alzheimerā slimības progresēšanu, galvenokārt darbojoties kā antioksidantiem, un arī veicot dažas tiešas anti-amiloīdu darbības. Šajā sakarā ir labi izpētīts fitoaleksīns, un resveratrols. Ir pierādīts, ka tie novērš Aβ fibrilu veidošanos *in vitro*, aizsargā neironu PC12 šūnas no Aβ toksicitātes un samazina ROS līmeni neironu šūnu kultūrā, pateicoties antioksidantu spējai vai antioksidantu aizsargfunkcijas augšupregulēšanai (Harvey, *et.al.*, 2011).

Vīnogu mizas ekstrakts satur sarkano vīnogu pigmentu maisījumu, kas satur pigmentētus tanīnus un antociānīnus. No ekstrakta polifenoliem lielāko daļu veido proantociānīni. Ir konstatēts, ka vīnogu mizas ekstrakta iekšķīgai lietošanai ir aizsargājoša iedarbība pret Aβ toksicitāti Alzheimerā slimības transgēnā peles modelī (Harvey, *et.al.*, 2011).

1.9. Antociānīni

Faktiski vārds antociānīns ir atvasināts no diviem grieķu vārdiem, *anthos* un *kyanos*, kas attiecīgi nozīmē “zieds” un “tumši zils”. Tiek uzskatīts, ka antociānīni ir svarīgi augiem, jo to

krāsa piesaista dzīvniekus, izraisot apputeksnēšanos. Sakarā ar spēcīgu gaismas absorbciju, tie var būt svarīgi arī, lai aizsargātu augus no ultravioletā starojuma radītiem bojājumiem.

Antocianīni ir flavanoīdi augļos un dārzeņos, kas padara tos spilgti sarkanus līdz zilus. Līdz šim dabā ir identificēti vairāk nekā 635 antocianīnu, kurus raksturo seši visizplatītākie aglikoni un to dažāda veida glikozilācijas un acilācijas produkti. Salīdzinājumā ar citiem flavonoīdiem uzturā ir liels antocianīnu daudzums, jo tie plaši izplatīti augos (He and Giusti, 2010).

Antocianīni ir ūdenī šķīstoši vakuolāri pigmenti, kas atrodami daudzos augu audos. Pārtikā izmantojamās antocianīna avotos ietilpst krāsaini augļi, piemēram, ogas, ķirši, persiki, vīnogas, granātāboli un plūmes, kā arī daudzi tumšas krāsas dārzeņi, sarkanais sīpols, redīsi, baklažāni. Lai arī tie visbiežāk uzkrājas ziedos un augļos, antocianīni ir atrodami arī lapās, stublājos un augu glabāšanas orgānos. Kopējais antocianīnu saturs dažādās augu sugās un pat šķirnēs ievērojami atšķiras. Pieejamie dati liecina par ļoti plašu antocianīnu daudzumu ogās, kas parasti nodrošina visvairāk antocianīnu vienā porcijā. Vides faktori, piemēram, gaisma, temperatūra un aukstums, arī ievērojami ietekmē antocianīna koncentrāciju (He and Giusti, 2010).

Balstoties uz daudziem šūnu līniju pētījumiem, dzīvnieku modeļiem un cilvēku klīniskajiem pētījumiem, tika izteikta hipotēze, ka antocianīniem piemīt pretiekaisuma, anti-kancerogēna, sirds un asinsvadus uzlabojošas, diabētu mazinošas īpašības, kuras visas ir vairāk vai mazāk saistītas ar to spēcīgo antioksidantu īpašībām (He and Giusti, 2010).

1.10. *Vaccinium* ģints

Vaccinium pieder pie sauszemes krūmu ģints *Ericaceae* ģimenes. Tā satāv no aptuveni 450 sugām ar plašu ģeogrāfisko izplatību ziemeļu puslodē, kā arī tropiskās Āzijas un Centrālās un Dienvidamerikas kalnos. Dažas sugas ir sastopamas arī Āfrikā un Madagaskarā, kā arī 92 sugas Ķīnā. Augsts *Vaccinium* sugu blīvums ir izplatīts Himalajos, Jaunajā Gvinejā un Dienvidamerikas Andu reģionā. Lielākā daļa sugu ir atrodamas atklātās kalnu nogāzēs tropos. Gandrīz 40% no *Vaccinium* sugām ir Dienvidaustrumu Āzijā (Malaizijas arhipelāgā, Jaunajā Gvinejā, Indijā, Ķīnā un Japānā) (Song and Hancock, 2010).

1.11. Ogu izspaidas

Ogu pārstrāde sulā parasti rada aptuveni 70-80% mērķa produkta un 20-30% blakusprodukta. Ogu sulas pārstrādes atlikumi, ko parasti dēvē par izspaidu, satur lielu

daudzumu uzturvielu un bioaktīvo savienojumu, un, tā kā ogas parasti tiek pakļautas minimālam pesticīdu līmenim, tas ir pievilcīgs barības vielu avots (Struck, *et.al.*, 2016).

Bioaktīvajiem savienojumiem ir veselību veicinoši efekti, tie samazina sirds un asinsvadu slimību, kā arī vēža risku, pateicoties antioksidantiem un pretiekaisuma iedarbībai, kas savukārt samazina oksidatīvo stresu (Struck, *et.al.*, 2016).

Ogas ir bagātas ar fenolskābēm, stilbēniem un flavanoīdiem, daļa no tiem, proti, antocianīni ir atbildīgi par augļu krāsu un to augsto antioksidantu spēju. Ogas parasti izspiež, apstrādā ar pektināzēm un silda pirms sulas ekstrakcijas, un ogu daļas, kas paliek presēšanas atlikumā, galvenokārt ir sēklas, miziņas un stublāji. Ogu izspaidas parasti pārstrādā dzīvnieku barībā, kompostē, izmanto biogāzes ražošanai vai vienkārši izmet. Tiek norādīts, ka 25-50% svaigu melleņu procianidīnu paliek sulā pēc sulas ekstrakcijas, kas norāda uz vērtīgu uztura savienojumu zaudēšanu, kad izspaidas iziet no pārtikas ķēdes. Turklāt daudzi fenola savienojumi, kas atrodas ogu mizās un sēklās, tiek saglabāti izspaidās (Struck, *et.al.*, 2016).

Tā kā ogu izspaidu mitruma saturs ir aptuveni 50%, un, tā kā tās satur dažādas sagremošanas barības vielas, tās ir ļoti pakļautas mikrobiem. Līdz ar to sākotnēja izspaidu apstrāde ir nepieciešama, lai nodrošinātu apmierinošu glabāšanas laiku. Parasti apstrādē ietilpst žāvēšana, kā arī malšana un kondicionēšana. Lai iegūtu izspaidu pulverus ar lielu daudzumu bioaktīvo savienojumu, ir svarīgi pielāgot apstrādes apstākļus žāvēšanas laikā, jo antocianīni viegli sadalās. Papildus izspaidu pulvera ražošanai, kas ir bagāts ar uztura šķiedrvielām un antioksidantiem, vēl viena pieeja, lai pievienotu izspaidu pievienotajai vērtībai, ir šo sastāvdaļu ekstrahēšana. Jaunākie pētījumi īpaši koncentrējas uz modernām, enerģijas taupīšanas tehnoloģijām antioksidantu ieguvei, piemēram, šķidrums ekstrakcija ar spiedienu, ekstrakcija ar kritisko šķidrums un ekstrakcija ar ultraskaņu vai mikroviļņu palīdzību (Struck, *et.al.*, 2016).

1.12. Ogu izspaidu saturs

Ogas parasti veido to miza, mīksts un sulīgs augļapvalks, starpšūnu sula un sēklas. Dažādu frakciju sadalījums tomēr ir lielā mērā atkarīgs no ogu šķirnes, piemēram, mellenēs attiecīgās mizas un sēklu masas daļas ir attiecīgi 19% un 1,5%. Pēc sulas ekstrakcijas ogu izspaidas, izņemot mizas un sēklas, satur arī stublājus, koka daļas un atlikušos fragmentus, kas paliek no mehāniskās novākšanas procedūrām (Struck, *et.al.*, 2016).

Žāvētu izspaidu galvenā sastāvdaļa ir uztura bagātinātājs no šūnu sienām, kurš sastāda apmēram 68%, kam seko olbaltumvielas (apmēram 15%) un lipīdi. Piemēram, upeņu izspaidas sastāv no 59% lignīna, 25% hemicelulozes, 12% celulozes un 3% pektīna. Svaigu augļu pektīna saturs svārstās no 0,2% līdz 1,79% upenēs un no 0,1% līdz 0,78% mellenēs. Attiecībā uz ogu

izspaidu ķīmisko sastāvu īpaša uzmanība tiek pievērsta fenola savienojumu koncentrācijai un izplatībai (Struck, *et.al.*, 2016).

2. MATERIĀLI un METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1 Reāģenti, palīgvielas un materiāli

- 3 Metanols, CH₃OH (Sigma-Aldrich)
- 4 Aminoguanidīns (Sigma-Aldrich)
- 5 Resveratrols (Sigma-Aldrich)
- 6 Liellopu seruma albumīns (BSA) (Sigma-Aldrich)
- 7 Metilglioksāls (MGO), 40% ūdens šķīdums (Sigma-Aldrich)
- 8 Tioflavīns T (ThT) (Sigma-Aldrich)
- 9 Amiloīd beta proteīna fragments 1-42 (Abeta 1-42), (Sigma-Aldrich)
- 10 PBS buferis (Sigma-Aldrich)
- 11 Fosfātbuferis 0,1 M pH 7,4 (Sigma-Aldrich)
- 12 Dimetilsulfoksīds (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- 13 Ogu izspiedu sausie ekstrakti (LU Ģeogrāfijas un Zemes zinātņu fakultātes Vides zinātnes nodaļa)
- 14 96-lauciņu melnas mikroplates (Greiner, Merck)
- 15 Mikropipetes (10-100;20-200; 1000 μL)
- 16 Multikanālu pipete
- 17 Plates pārklājošas plēves (Sarstedt, Vācija)
- 18 Šķidrums uzpildes vanniņas (Sarstedt, Vācija)
- 19 Ependorf mēģenes (Sarstedt, Vācija)
- 20 Pipešu uzgaļi, (Sarstedt, Vācija)
- 21 Ependorf mēģeņu statīvi (Sarstedt, Vācija)



Attēls 2.1.1 96-lauciņu mikroplate

96-lauciņu melnajā platē augšpusē ir sanumurētas rindas un kreisajā sānu malā ir burti.

2.1.2. Aparatūra

1. Mikroplašu lasītājs TEKAN Infinite 200 PRO ar i-control software (Tecan Trading AG, Šveice)
2. Analītiskie svāri Precisa XB 120 A, SERIES 320 XB D99 – D9 – 030.
3. Vortex maisītājs, Biosan, Latvija
4. Termostats, inkubators ar kratītāju ES-20/00, Biosan, Latvija
5. Dators, savienots ar mikroplašu lasītāju.

2.2. Metodes

2.2.1. AGE veidošanās liellopu seruma albumīna un metilglioksāla reakcijā

Ogu izspiedu sausos ekstraktus nosver uz analītiskajiem svāriem un izšķīdina metanolā koncentrācijā 100 mg/ml. Šo šķīdumu atšķaida ar PBS buferi pH 7.00 līdz koncentrācijai 10 mg/ml un uzglabā ledusskapī eksperimentu veikšanai. Šajā eksperimentā ekstraktus atšķaida ar buferi koncentrācijās 2; 1; 0,5 un 0,25 mg/ml. Aminoguanidīnu nosver un izšķīdina buferī koncentrācijā 10; 2; 1; 0,5; 0,25 mg/ml. Pētāmās koncentrācijas būs divreiz mazākas, jo notiks iekšēja atšķaidīšanās. BSA nosver un izšķīdina ūdenī ar aprēķinu, lai vienas reakcijas 0,5 ml tilpumā gala koncentrācija būtu 10 mg/ml. Metilglioksāla 40% ūdens šķīdumu iemēra Ependorf mēģenē, lai vienas reakcijas izvēlētajā gala tilpumā būtu 5 mM. Molmasa metilglioksālam ir 72,06266 g/mol. 40% šķ. ir 5,55 M. Lai iegūtu 5 mM, būtu jāatšķaida 1111 reizes. 5,4 µl MGO 40% uz 1 ml. Kopējais vajadzīgais tilpums ir atkarīgs no paraugu skaita – 5 ekstrakti un katram 4 koncentrācijas = 20 paraugi, aminoguanidīnam 5 koncentrācijas = 5 paraugi, pozitīvā kontrole =1, kopā 26 Ependorf mēģenes ar paraugiem un 13 ml kopējā visu paraugu tilpuma.

Tātad 0,5 ml maisījums vienā Ependorf mēģenē satur ekstraktus vai aminoguanidīnu dažādās koncentrācijās, BSA 40 mg/ml un MGO 20 mM, ņemot vērā iekšējo atšķaidīšanos.

2.2.1.1. Tabula

Vienas parauga koncentrācijas un reaģentu maisījuma sastāvs vienā mēģenē

	Kontrole, maksim. AGE	Paraugi, dažādās konc., 0,25 ml	Aminoguanidīns, 0,25 ml
MGO 20 mM	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml

BSA 40 mg/ml	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml
Buferis	0,25 ml	-	-
Kopējais tilpums	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Reaģentu kontrolei pagatavo tādus pašus šķīdumus, bet nepievieno MGO. Mēģenes saliek statīvos un 7 dienas tur termostatā 37⁰ C grādu temperatūrā tumšā vietā. Tad ar pipeti iemēra 150 µl katra parauga melnajā 96-lauciņu plate triplikātos un mēra fluorescenci ar mikroplašu lasītāju pie ierosinājuma viļņiem 360 nm un emisijas viļņiem 435 nm. Eksperimenti atkārtoti trīs reizes un katrs paraugs mērīts triplikātos. Aprēķinot relatīvās fluorescences vienības (RFU), no paraugu ar MGO fluorescences RFU atņem atbilstošo paraugu reaģentu kontroles RFU. Metode atbilst publicētai (Liu *et al.*, 2016).

2.2.2. Abeta 1-42 agregātu ar MGO veidošanās metode

Ekstraktus atšķaida līdz 1,5 un 0,3 mg/ml koncentrācijai, aminoguanidīnu 0,3 mg/ml un MGO 3 mM. Atšķaidījumus veic ar aprēķinu, lai gala reakcijā būtu šādas koncentrācijas – ekstrakti 0,5 un 0,1 mg/ml, aminoguanidīns 0,1 mg/ml un MGO 1 mM. Kopā 12 paraugi Ependorfa mēģenēs. Amiloīd beta 1-42 proteīns spontāni veido agregātus ūdens šķīdumā, tāpēc liofilizētā pulvera visu fasējumu izšķīdina DMSO nelielā daudzumā un atšķaida ar fosfātbufferi pH 7,4 trīsreiz lielākā koncentrācijā (150 µM), lai kopējā paraugu tilpumā būtu 50 µM koncentrācija. Molmasa Abeta 1-42 ir 4514,04. Mēģenēs sagatavo šķīdumu maisījumus, un tad ar pipeti iemēra 40 µl ekstrakta vai aminoguanidīna, 40 µl Abeta 1-42 150 µM un 40 µl MGO 3 mM melnajā 96-lauciņu plates vienā lauciņā triplikātos un ar multikanālu pipeti pievieno 120 µl tioflavīna T (ThT) 50 µM šķīduma. Izmēra fluorescenci ar mikroplašu lasītāju pie ierosinājuma viļņiem 450 nm un emisijas viļņiem 490 nm. Plati aizlīmē ar plēvi un 3 dienas tur termostatā 37⁰ C grādu temperatūrā tumšā vietā. Pēc tam vēlreiz mēra fluorescenci pie ierosinājuma viļņiem 450 nm un emisijas viļņiem 490 nm. Tioflavīns T tiek plaši izmantots amiloīdu fibrilu fluorometriskajā noteikšanā *in vitro*. Ja nav amiloīdu šķiedru, krāsviela vāji fluorescē pie ierosmes un emisijas maksimuma attiecīgi 350 un 435 nm. Amiloido šķiedru klātbūtnē tioflavīns T piesaistās pie tām un veidojas spilgta fluorescences pie ierosmes un emisijas maksimuma attiecīgi 450 un 490 nm. Fluorescences izmaiņas ir lineāras no 0 līdz 2,0 µg / ml amiloīda fibrilu. Eksperimentā var izvēlēties, vai mērīt nepiesaistītā tioflavīna T fluorescenci pie 350/435 nm viļņiem, vai mērīt saistīto tioflavīnu T pie viļņiem 450/490 nm. Pirmajā gadījumā, ja būtu agregācijas inhibīcija, tad inhibitori fluorescenci palielinātu, jo būtu mazāk agregātu, kur tioflavīnam piesaistīties. Otrajā gadījumā inhibitori tioflavīna T fluorescenci samazina, jo ir samazinājusies agregātu rašanās.

Eksperimenti atkārtoti trīs reizes un katrs paraugs mērīts triplikātos. Aprēķinot relatīvās fluorescences vienības (RFU), no paraugu beigu fluorescences RFU atņem atbilstošo paraugu iepriekš izmērīto RFU. Aprēķina vidējo inhibīcijas efektu un izsaka %. Metode atbilst publicētai (Liu *et al.*, 2016).

2.2.3. Abeta 1-42 agregātu veidošanās paaugstinātā temperatūrā

Līdzīgi kā Liu *et al.* (2016) pētījumā par references vielu tika ņemts resveratrols koncentrācijā 0,1 mg/ml. Ekstraktus atšķaida līdz 0,5 un 0,1 mg/ml koncentrācijai. Mēģenēs sagatavo šķīdumu maisījumus, lai gala koncentrācijas ekstraktiem būtu 0,5 un 0,1 mg/ml, bet resveratrolam 0,1 mg/ml un Abeta 1-42 50 μ M. Tad ar pipeti iemēra 50 μ l ekstrakta koncentrācijās 1 un 0,2 mg/ml vai resveratrola 0,2 mg/ml un pievieno 50 μ l Abeta 1-42 100 μ M melnās 96-lauciņu plates vienā lauciņā triplikātos un ar multikanālu pipeti pievieno 100 μ l tioflavīna T (ThT) 50 μ M šķīduma. Izmēra fluorescenci ar mikroplāšu lasītāju pie ierosinājuma viļņiem 450 nm un emisijas viļņiem 490 nm. Plati aizlīmē ar plēvi un 3 dienas tur termostātā 37⁰ C grādu temperatūrā tumšā vietā. Pēc tam vēlreiz mēra fluorescenci pie ierosinājuma viļņiem 450 nm un emisijas viļņiem 490 nm. Eksperimenti atkārtoti trīs reizes un katrs paraugs mērīts triplikātos. Aprēķinot relatīvās fluorescences vienības (RFU), no paraugu beigu fluorescences RFU atņem atbilstošo paraugu iepriekš izmērīto RFU. Aprēķina vidējo inhibīcijas efektu un izsaka %.

Datu statistiskā analīze

Visos eksperimentos paraugi tika mērīti triplikātos un eksperimenti atkārtoti trīs reizes. Mērījumiem aprēķināta vidējā relatīvā fluorescences (RFU) ar standartnovirzi (SD). Inhibīcija % aprēķināta pēc vienādojuma: inhibīcija % = $[1 - (\text{RFU paraugam} / \text{RFU kontrolei})] * 100$. Statistiskā ticamība novērtēta ar vienvirziena ANOVA testu (one-way ANOVA test) ar Tukey-Kramer post hoc salīdzinājumu līdzīgi kā publikācijā (Liu *et al.*, 2016), izmantojot GraphPad Prism 7 programmatūru (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ASV). Ticamība apzīmēta kā $P \leq 0.05$.

3. REZULTĀTI

3.1. Ogu izspaidu ekstraktu AGE veidošanās inhibīcija *in vitro*

Pētījām ogu izspaidu ekstraktu ietekmi uz AGE veidošanos. AGE veidošanās notika seruma albumīna reakcijā ar MGO septiņu dienu laikā, inkubējot paraugus termostatā 37⁰ C grādu temperatūrā un tumsā. Kā pozitīvo references savienojumu izmantojām aminoguanidīnu.

Iegūtie rezultāti (3.1.1. tabula) rāda, ka visi ekstrakti no koncentrācijas atkarīgā veidā inhibēja AGE veidošanos. Aminoguanidīns visās koncentrācijās aizkavēja AGE veidošanos.

3.1.1.tabula

Aminoguanidīna un ogu izspaidu ekstraktu AGE veidošanās inhibīcija (%)

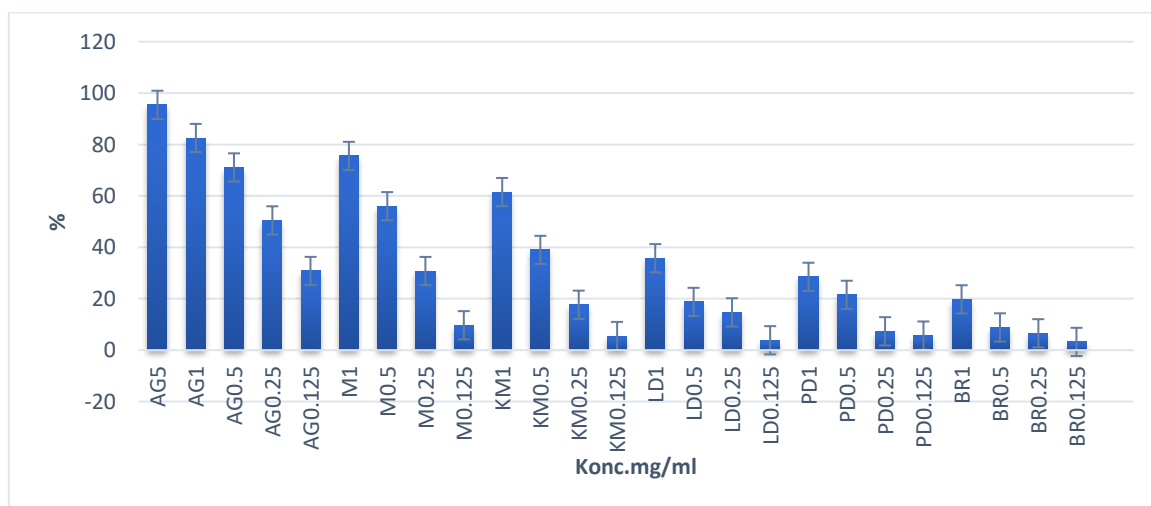
Vielas	Konc. mg/ml	Inhibīcijas %	SD	P vērtība vs. kontrolē
Kontrolē		0	5	
AG	5	95,43299	10	5,54886E-06
	1	82,53266	8	1,07398E-05
	0,5	71,07402	10	4,82766E-05
	0,25	50,46928	13	0,000455114
	0,125	30,79826	7	0,001681708
M	1	75,55394	6	1,54579E-05
	0,5	55,99419	2	4,75056E-05
	0,25	30,78374	3	0,000625226
	0,125	9,690373	2	0,036495679
KM	1	61,49976	1,33	3,22726E-05
	0,5	38,98887	1,13	0,000194486
	0,25	17,66812	2,4	0,004065793
	0,125	5,500726	2	0,162033855
LD	1	35,76681	2,09	0,000295089
	0,5	18,76149	1,24	0,003730662
	0,25	14,70731	2,1	0,007990993

	0,125	3,846154	0,9	0,290091899
PD	1	28,51476	10	0,01235078
	0,5	21,51911	1,78	0,002108494
	0,25	7,343977	5,22	0,144034457
	0,125	5,674891	2,14	0,146682266
BR	1	19,76294	0,44	0,002550465
	0,5	8,848573	0,66	0,040106304
	0,25	6,560232	1,61	0,098668296
	0,125	3,207547	3,07	0,398959727

Apzīmējumi: AG – aminoguanidīns, M- melleņu ekstrakts, KM – krūmelleņu, LD - lieloģu dzērveņu, PD – purva dzērveņu, BR – brūkleņu.

AGE veidošanās inhibēšanas spēja visvairāk izteikta melleņu ekstraktam. Aminoguanidīns 5 mg/ml gandrīz pilnīgi nobloķē AGE veidošanos, salīdzinot ar kontroli, kas ir seruma albumīna un MGO veidotais AGE bez inhibitora, kad inhibīcija ir 0. Melleņu ekstraktam koncentrācijā 1 mg/ml ir līdzīgs efekts kā aminoguanidīnam koncentrācijā 1 mg/ml, un tikai melleņu ekstrakts visās pētītajās koncentrācijās no 1 mg/ml līdz 0,125 mg/ml inhibē AGE veidošanos. Krūmmelleņu un lieloģu dzērveņu ekstrakti inhibē AGE veidošanos sākot ar 0,25 mg/ml, bet dzērveņu un brūkleņu ekstrakti tikai koncentrācijās 1 un 0,5 mg/ml (kad $P \leq 0,05$).

Ilustrācijai ekstraktu AGE veidošanās inhibīcijas % parādīti attēlā 3.1.1.



3.1.1. att. Ogu izspaidu ekstraktu un aminoguanidīna AGE veidošanās inhibīcija %

Apzīmējumi: AG – aminoguanidīns, M- melleņu ekstrakts, KM – krūmelleņu, LD - lieloģu dzērveņu, PD – purva dzērveņu, BR – brūkleņu ekstrakts.

No ogu ekstraktiem augstākais inhibīcijas procents ir mellenēm koncentrācijā 1mg/ml. Vismazāk AGE veidošanos ietekmē brūkleņu un dzērveņu ekstrakti, kuriem statistiski ticama inhibīcija ir tikai 1 mg/ml un 0,5 mg/ml koncentrācijā.

3.2. Ogu ekstraktu Abeta 1-42 un MGO agregātu veidošanās inhibīcija

Izmantojām divas metodes Abeta 1-42 agregācijas pētīšanai. Agregātu rašanās novērtēšanai izmantojām Abeta1-42 reakciju ar MGO un amiloīd beta 1-42 proteīna spontānu agregātu veidošanos ūdens šķīdumā paaugstinātā temperatūrā. Abeta agregātu iekrāsošanai un fluorescences mērīšanai izmantojām tioflavīnu T, kas veido fluorescējošu savienojumu pēc piesaistīšanās pie Abeta1-42 agregāta.

Arī šajā testā kā pozitīvo references vielu izmantojām aminoguanidīnu. Vispirms izmēra sākotnējo fluorescenci un pēc trīs inkubēšanas dienām radušos tioflavīna T un Abeta1-42 fibrillu kompleksa fluorescenci. Tabula 3.2.1. parāda, cik reizes pieaug tioflavīna T fluorescences salīdzinot ar fona fluorescenci, kas parāda tā piesaistīšanos pie amiloīda agregāta un apliecina, ka agregāts tiešām ir veidojies.

3.2.1.tabula

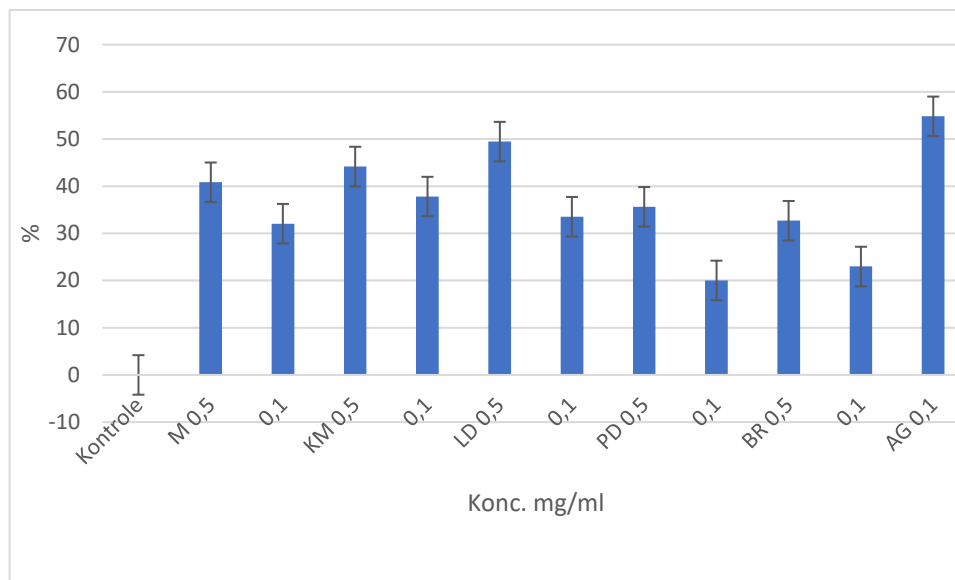
Tioflavīna T piesaistīšanās Abeta1-42-MGO kompleksam dinamika

Vielā	Konc. mg/ml	Vidējais RFU pirms inkubēšanas	Vidējais RFU pēc inkubēšanas	RFU pēc/RFU pirms
Kontrole	0	343	772	2,25
M	0,5	425	679	1,59
	0,1	424	715	1,68
KM	0,5	506	745	1,47
	0,1	459	726	1,58
LD	0,5	416	633	1,52
	0,1	436	722	1,65
PD	0,5	458	734	1,6
	0,1	461	805	1,74
BR	0,5	509	798	1,56
	0,1	482	813	1,38

M- melleņu, KM – krūmelleņu, LD – lieloģu dzērveņu, PD – purva dzērveņu un BR – brūkleņu ekstrakts. Relatīvās fluorescences vienības (RFU).

Pēc 3 dienu inkubācijas tioflavīna T fluorescences RFU kontroles paraugos ir pieaugusi 2,25 reizes, kas apliecina, ka ir izveidojies Abeta1-42 un MGO komplekss. Redzam, ka ekstraktu pievienošana reakcijas maisījumam kavē šāda agregāta veidošanos un RFU pieaug mazāk par 2,25 reizēm.

Tālāk aprēķinājām ekstraktu vidējo inhibīcijas efektu un izteicām %.



3.2.1. att. Ekstraktu un aminoguanidīna Abeta1-42 un MGO agregātu veidošanās inhibīcija (%).

M- melleņu, KM – krūmmelleņu, LD – lieloģu dzērveņu, PD – purva dzērveņu un BR – brūkleņu ekstrakts, AG- aminoguanidīns.

Visi ekstrakti un aminoguanidīns inhibēja Abeta 1-42 un MGO agregātu veidošanos, salīdzinot ar kontroli ($P < 0,05$). Aminoguanidīns koncentrācijā 0,1 mg/ml inhibēja par 55%, melleņu ekstrakts 0,5 mg/ml inhibēja par 40%, krūmmelleņu – 44%, lieloģu dzērveņu 49%, dzērveņu -35% un brūkleņu 32%. Koncentrācijā 0,1 mg/ml ekstrakti inhibēja Abeta 1-42 un MGO agregātu veidošanos vidēji par 20-37%.

3.3. Oģu ekstraktu Abeta 1-42 agregātu spontāna veidošanās paaugstinātā temperatūrā

Mēs pētījām arī Abeta 1-42 agregātu veidošanos paaugstinātā temperatūrā bez MGO klātbūtnes. Paraugi tika inkubēti 3 dienas 37°C temperatūrā. Ekstraktu efektu salīdzinājumam kā referenci izmantojām resveratrolu 0,1 mg/ml koncentrācijā.

Novērojām, ka pēc 3 dienu inkubācijas fluorescences RFU kontroles paraugos ir pieaugušas, bet ekstraktu un resveratrola pievienošana kavē Abeta1-42 agregātu veidošanos un

attiecīgi tioflavīns T mazāk piesaistās fibrilām, kas spontāni veidojas. Šajā testā tika pārbaudītas ogu ekstraktu spējas inhibēt spontānu Abeta 1-42 agregātu veidošanos.

3.3.1.Tabula

Tioflavīna T piesaistīšanās pie Abeta 1-42 agregātiem

Vielas	Koncentrācija mg/ml	Vidējais RFU pirms	Vidējais RFU pēc	RFU pēc/RFU pirms
Kontrole	0	9,00	191,33	21,26
M	0,5	147,67	277,00	1,88
	0,1	57,33	204,33	3,56
KM	0,5	142,00	248,33	1,75
	0,1	57,00	198,33	3,48
LD	0,5	67,33	217,67	3,23
	0,1	24,33	135,33	5,56
PD	0,5	73,67	147,00	2,00
	0,1	24,33	151,33	6,22
BR	0,5	130,00	227,33	1,75
	0,1	35,33	178,67	5,06
Resveratrols	0,1	14,00	76,00	5,43

M- melleņu, KM – krūmmelleņu, LD – lieloģu dzērveņu, PD – purva dzērveņu un BR – brūkleņu. Relatīvās fluorescences vienības (RFU).

Pēc 3 dienu inkubācijas 37⁰ C temperatūrā tioflavīna T fluorescences RFU kontroles paraugos ir pieaugusi 21,26 reizes, kas apliecina, ka ir izveidojies Abeta1-42 agregāts. Redzams, ka ekstraktu pievienošana reakcijas maisījumam kavē Abeta 1-42 spontānu agregātu veidošanos un visās koncentrācijās RFU pieaug mazāk par 21,26 reizēm. Temperatūras ietekmē amiloīda fibrilas ir veidojušās vairāk nekā reakcijā ar MGO.

Pētīto ekstraktu un resveratrola inhibīcijas efektivitāte salīdzināta 3.3.2. tabulā.

Ogu ekstraktu un resveratrola Abeta 1-42 agregātu spontānās veidošanās inhibīcija, %

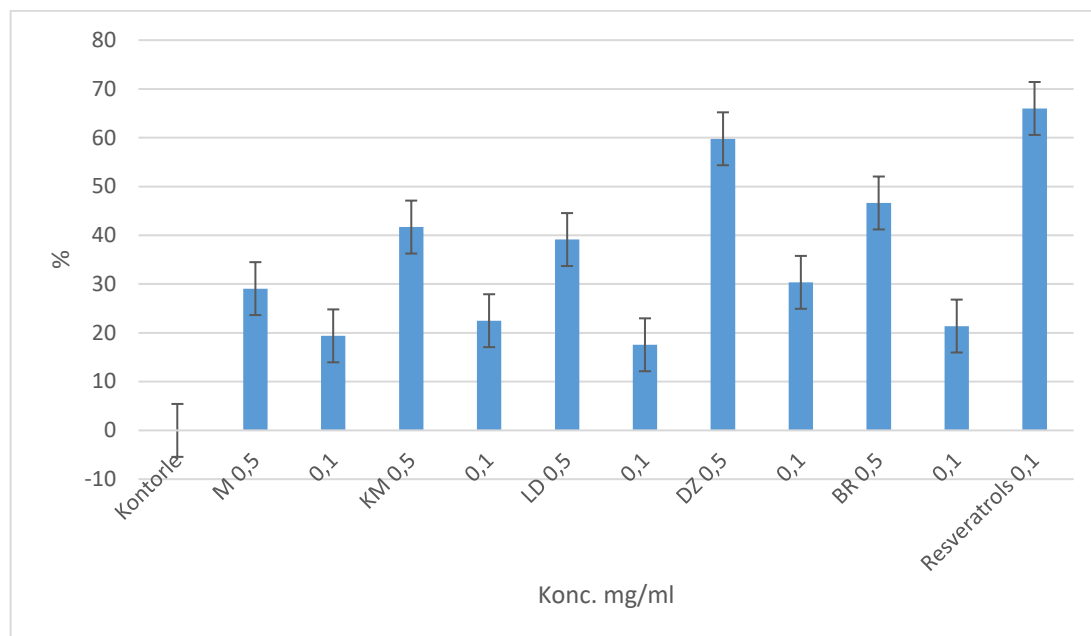
Paraugs un konc. mg/ml	Inhibīcijas %	SD	P
kontrolē	0	5,5	0,000122549
M 0,5	29	2,8	0,037952989
0,1	15,7	5,3	0,000179981
KM 0,5	41	8	0,001384242
0,1	22	7	2,99011E-05
LD. 0,5	39	2	0,001693992
0,1	17	4,9	7,75146E-06
PD. 0,5	59	3,2	0,000325313
0,1	30	6,24	1,69783E-05
BR. 0,5	46,6	2,5	0,002630388
0,1	21,3	8,5	0,787422394
Resveratrols 0,1	66	1,73	3,51483E-06

M- melleņu, KM – krūmmelleņu, LD – lieloģu dzērveņu, PD – purva dzērveņu un BR – brūkleņu ekstrakts. Statistiskā ticamība aprēķināta pret kontroli, kas ir Abeta 1-42 bez inhibitoru klātbūtnes, kad inhibīcija ir 0%.

Tabulā ir redzams, ka vislielākais inhibīcijas procents ir resveratrolam (66%). Visi oģu ekstrakti, ticami inhibēja Abeta 1-42 agregāciju koncentrācijās 0,5 un 0,1 mg/ml, izņemot brūklenes ekstraktu 0,1 mg/ml. Ir redzams, ka purva dzērveņu ekstraktam koncentrācijā 0,5mg/ml ir vislielākais inhibīcijas procents starp oģu ekstraktiem, savukārt vismazākais inhibīcijas procents ir melleņu ekstraktam. Melleņu ekstrakts 0,5 mg/ml inhibēja amiloīda

agregātu veidošanos par 29%, krūmelleņu – 41%, lielo dzērveņu 39%, purva dzērveņu -59% un brūkleņu 46,6%. Koncentrācijā 0,1 mg/ml ekstrakti inhibēja Abeta 1-42 agregātu spontānu veidošanos vidēji par 15,7-30%.

Ekstraktu amiloīdu agregātu inhibīcijas efektivitāte ilustratīvi parādīta 3.3.1. attēlā.



3.3.1. att. Ekstraktu un resveratrola Abeta1-42 spontānu agregātu veidošanās inhibīcija (%). M- melleņu, KM – krūmelleņu, LD – lielo dzērveņu, PD – purva dzērveņu un BR – brūkleņu ekstrakts.

4. DISKUSIJA

Līdz šim ievērojams pierādījumu kopums liecina, ka advancētie glikēšanas gala produkti ir saistīti un, iespējams, atbildīgi par novecošanās laikā novērotajām izmaiņām un daudzu ar vecumu saistītu slimību, tādu kā 2.tipa cukura diabēts, Alcheimera slimība, kardiovaskulārās slimības attīstību (Chaudhuri, *et.al.*, 2018). Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot vai dabā sastopamās vielas, kuras cilvēki lieto ikdienā un uzturā, spēj inhibēt vai daļēji apturēt šo produktu veidošanos.

Eksperimentos tika pētīti *Vaccinium* ģints melleņu (*Vaccinium myrtillus*), krūmmelleņu (*Vaccinium corymbosum*), lielogu dzērveņu (*Vaccinium macrocarpon*), dzērveņu (*Vaccinium oxycoccus*) un brūkleņu (*Vaccinium vitis-idaea*) ogu izspaidu ekstraktu efekti uz AGE un Abeta 1-42 agregātu veidošanos *in vitro*. Izvēlētās pārbaudes metodes bija līdzīgas agrāk publicētajām (Li *et.al.*, 2012). Kā pozitīvo references vielu AGE testā izvēlējāmies aminoguanidīnu. Aminoguanidīns ir nukleofils hidrazīna sintētisks atvasinājums, kas bloķē AGE veidošanos. Diemžēl tas nekļuva par zālēm, jo drošības apsvērumu un zemās *in vivo* efektivitātes dēļ tika atsaukts no klīnisko pētījumu trešās stadijas (Thornalley 2003). Pēc šīs neveiksmes ar sintētiskajām vielām vairāki dabas produkti tika pētīti kā AGE veidošanās inhibitori un atzīti par drošiem lietošanā cilvēkiem (Lee *et al.*, 2006). Piemēram, augsta AGE inhibīcijas aktivitāte atrasta melisas etanola ekstraktam (Miroliaei *et al.* 2011), zaļās tējas ekstraktam (Babu *et al.*, 2008) un kafijas sastāvā esošajām skābēm (Verzelloni *et al.*, 2011). Cory ar līdzautoriem (2014) salīdzināja 12 ēriku dzimtas ogu ekstraktu AGE veidošanās inhibīcijas spēju. Starp tām bija arī dzērvenes, kas ir iekļautas mūsu pētījumā. Pētnieki secināja, ka AGE inhibīcijas efekts korelē ar kopējo polifenolu saturu un antiradikālo spēju, bet vājāk korelē ar antocianīnu sastāvu. Mūsu pētījumā iekļauto ogu izspiedu ekstraktu ķīmiskais sastāvs parāda, ka ekstraktu kopējais polifenolu daudzums ir no 36 (melleņu ekstraktā) līdz 55 (krūmmelleņu ekstraktā) g uz 100g sausa ekstrakta (Muceniece *et al.*, 2019), bet antocianīnu saturs ekstraktiem ir izteikti atšķirīgs. Visvairāk ir krūmmellenēs (34,75 g/100g), mellenēs (13,26 g/100g) un daudz mazāk dzērvenēs (5,95 g/100g), lielogu dzērvenēs (3.13g/100g) un brūklenēs (1,59 g/100g ekstrakta). Tomēr mūsu eksperimentos vislabāk AGE veidošanos inhibēja melleņu izspiedu ekstrakts nevis krūmmelleņu ekstrakts, kuram kopējais polifenolu saturs ir lielāks nekā melleņu ekstraktam. Un radikāļa DPPH koncentrācijas samazināšanas testā vislielāko antiradikālo spēju uzrādīja dzērveņu un brūkleņu ekstrakti (Muceniece *et al.*, 2019).

Par *Vaccinium* ģints ogām zinātniskajā literatūrā ir publicēti daudzi pētījumu rezultāti, it īpaši par to sastāvu un cilvēka veselībai labvēlīgajām vielām, ko tās satur. Visbiežāk no

Vaccinium ģints ogu sastāva tiek pieminēti daudzie polifenoli un antociānīni, kuriem ir tādas īpašības kā, kardiovaskulārās sistēmas funkciju uzlabošana (Habanova, *et al.*, 2016). Pētījums pierādīja, ka melleņu (*Vaccinium myrtillus* L.) ogu uzņemšana uzturā samazināja kardiovaskulāro slimību risku un uzlaboja lipoproteīnu sastāvu pacientiem, kuri iekļāva tās savā uzturā. Citā pētījumā tika minēts, ka *Vaccinium arctostaphylos* ogām ir sistoliskā un diastoliskā asinsspiediena samazinošas spējas pacientiem ar lieko svaru (Kianbakht, 2019). Protams, tiek minētas arī citas īpašības, piemēram, pretiekaisuma un antioksidantu īpašības, kas tiek plaši aprakstītas (Samad, *et al.*, 2014) pētījumā.

Ogu ekstraktu antioksidantu un pretiekaisuma efekti kalpo par pamatu tālāk pētīt to neiroprotektīvās īpašības, kuras varētu izmantot, lai novērstu saslimšanas riskus vai atvieglotu Parkinsona un Alzheimerera slimību pacientu simptomus (Thornthwaite, 2020). Daži pētījumi jau ir parādījuši, ka dabīgie polifenoli varētu būt potenciāla stratēģija Alzheimerera slimības papildterapijai vai profilaksei (Han, *et.al.*, 2015). Pēdējā desmitgadē ir pieaugusi zinātniskā interese par ogām, kas bagātas ar polifenoliem, jo to patēriņš ir saistīts ar vecumu saistītu kognitīvo un motorisko traucējumu samazināšanos. Ogu polifenolu efekti tiek novērtēti to farmakoloģiskās, antioksidatīvās, pretiekaisuma un citoprotektīvās aktivitātes dēļ (Bhullar, *et.al.*, 2015). Daudzi dabiski sastopami savienojumi ir padziļināti pētīti, lai palēninātu vai novērstu amiloīdproteīna agregāciju un nervu šūnu bojā eju Alzheimerera slimniekiem. Ir pierādīts, ka fitoaleksīns, un resveratrols novērš Aβ fibrilu veidošanos *in vitro*, aizsargā neironu PC12 šūnas no Aβ toksicitātes un samazina ROS līmeni neironu šūnu kultūrā (Harvey, *et.al.*, 2011). Vīnogu mizas ekstrakta proantociānīniem pierādīta aizsargājoša iedarbība pret Aβ toksicitāti Alzheimerera slimības transgēnā peles modelī (Harvey, *et.al.*, 2011). No mūsu pētījumā iekļautajiem melleņu ģints ogu izspiedu ekstraktiem visvairāk proantociānīnu bija purva dzērveņu un melleņu ekstraktos, bet kopējais polifenolu un antociānīnu daudzums krūmmelleņu ekstraktam (Muceniece *et al.*, 2019). Ogu ekstraktu saturs ļāva izteikt hipotēzi, ka tie varētu samazināt Abeta1-42 agregātu veidošanos *in vitro*. Lai noskaidrotu vai pētītie ogu ekstrakti inhibē Abeta 1-42 agregantu veidošanos, izvēlējāmies divus testus – Abeta1-42 reakciju ar MGO un Abeta1-42 termoagregācijas testus. Abeta1-42 reakcijā ar MGO mēs izvēlējāmies kā pozitīvo references vielu aminoguanidīnu. Citu autoru pētījumos atrasts, ka no zaļās tējas izolētais epigallokatehīna gallāts inhibē Abeta 1-42 agregāciju (Churches, *et al.*, 2014), un to arī varētu izmantot kā pozitīvās references savienojumu. Pie tam metilepigallokatehīna-3-O-gallāts tika identificēts melleņu ģints ogu ekstraktos no 59-104 μg uz g ekstraktu polifenolu daudzuma (Muceniece *et al.*, 2019). Bet izvēlējāmies aminoguanidīnu, jo tam ir specifiska spēja nobloķēt MGO un neļaut tam piesaistīties pie lieliem

proteīniem (Solis-Calero et al., 2014). Mūsu iegūtie rezultāti liecina, ka visi pieci *Vaccinium* ogu izspaidu ekstrakti inhibē Abeta1-42 ar MGO kompleksa agregātu veidošanos *in vitro*, salīdzinot ar kontroles grupu.

Nākamā testa mērķis bija noskaidrot vai ogu ekstraktiem ir spējas inhibēt spontānu Abeta 1-42 agregātu veidošanos paaugstinātā temperatūrā. Par pozitīvās references vielu šajā eksperimentā tika izvēlēts resveratrols. Resverastrolam jau ir pierādīta un aprakstīta Abeta 1-42 agregātu veidošanās inhibīcija (Al-Edresi, et al., 2020). Vislielākā Abeta1-42 agregātu veidošanās inhibīcijas spēja, salīdzinot ar kontroles grupu, bija dzērveņu ekstraktam, savukārt vissliktākā inhibīcija bija melleņu ekstraktam.

Kopumā, visos eksperimentos iegūtie dati liecina, ka melleņu, krūmmelleņu, lieлогу dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu izspaidu ekstrakti inhibē AGE producēšanos un Abeta 1-42 fibrillu veidošanos. Ogu izspaidām varētu būt farmaceitiska produkta potenciāls nākotnē, kuru varētu izmantot kā antioksidantu, pretiekaisuma un neiroprotektīvu līdzekli (Klavins, et.al., 2018), bet lai izstrādātu šādu produktu ir nepieciešami papildus *in vivo* pētījumi.

5. SECINĀJUMI

1. *Vaccinium spp.* melleņu, krūmelleņu, lielloģu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu izspiedu ekstrakti inhibē dziļas glikēšanas produktu (AGE) veidošanos lielloģu seruma albumīna un metilglioksāla reakcijā *in vitro*. Melleņu ekstraktam un aminoguanidīnam koncentrācijā 1 mg/ml ir līdzīgs efekts, un tikai melleņu ekstrakts visās pētītajās koncentrācijās no 1 mg/ml līdz 0,125 mg/ml inhibē AGE veidošanos. Citu ekstraktu efekti ir vājāki.
2. Visi ogu ekstrakti un aminoguanidīns inhibē Abeta 1-42 un MGO agregātu veidošanos, salīdzinot ar kontroli.
3. *Vaccinium spp.* ogu izspiedu ekstrakti inhibē Abeta 1-42 agregātu veidošanos 37⁰ Celsija grādu temperatūrā (termo agregācija) koncentrācijās 0,5 un 0,1 mg/ml, izņemot brūklenes ekstraktu 0,1 mg/ml. Vislielāko inhibīciju uzrāda resveratrols (0,1 mg/ml koncentrācijā 66%).

6. PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību savai darba vadītājai, profesorei, Dr. habil. biol. Rutai Muceniecei par iespēju izstrādāt bakalaura darbu un par darba vadīšanu. Liels paldies Latvijas Universitāte Ģeogrāfijas un Zemes zinātņu fakultātes Vides zinātnes nodaļas pētniekiem par ogu izspiedu sausajiem ekstraktiem. Liels paldies par atbalstu Mg. pharm. Kasparam Jēkabsonam un Mg. pharm. Reinim Rembergam.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Al-Edresi, S., Alsalahat, I., Freeman, S., Aojula, H. and Penny, J.,** 2020. Resveratrol-mediated cleavage of amyloid β 1-42 peptide; potential relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*,.
2. **Babu, P., Sabitha, K. and Shyamaladevi, C.,** 2008. Effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of tail tendon collagen in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), pp.280-285.
3. **Bansode, S. and Gacche, R.,** 2019. Glycation-induced modification of tissue-specific ECM proteins: A pathophysiological mechanism in degenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(11), p.129411.
4. **Bhullar, K. and Rupasinghe, H.,** 2015. Partridgeberry polyphenols protect primary cortical and hippocampal neurons against β -amyloid toxicity. *Food Research International*, 74, pp.237-249.
5. **Chaudhuri, J., Bains, Y., Guha, S., Kahn, A., Hall, D., Bose, N., Gugliucci, A. and Kapahi, P.,** 2018. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell Metabolism*, 28(3), pp.337-352.
6. **Churches, Q., Caine, J., Cavanagh, K., Epa, V., Waddington, L., Tranberg, C., Meyer, A., Varghese, J., Streltsov, V. and Duggan, P.,** 2014. Naturally occurring polyphenolic inhibitors of amyloid beta aggregation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(14), pp.3108-3112.
7. **Gkogkolou, P. and Böhm, M.,** 2012. Advanced glycation end products. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), pp.259-270.
8. **González, I., Morales, M. and Rojas, A.,** 2020. Polyphenols and AGEs/RAGE axis. Trends and challenges. *Food Research International*, 129, p.108843.
9. **Habanova, M., Saraiva, J., Haban, M., Schwarzova, M., Chlebo, P., Predna, L., Gažo, J. and Wyka, J.,** 2016. Intake of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) reduced risk factors for cardiovascular disease by inducing favorable changes in lipoprotein profiles. *Nutrition Research*, 36(12), pp.1415-1422.
10. **Han, J., El Omri, A., Sasaki, K. and Isoda, H.,** 2015. Caffeoylquinic Acid Protects against Alzheimer's Disease through Inhibition of Amyloid Beta-Induced Toxicity. *Coffee in Health and Disease Prevention*, pp.729-735.
11. **Harris, C., Cuerrier, A., Lamont, E., Haddad, P., Arnason, J., Bennett, S. and Johns, T.,** 2014. Investigating Wild Berries as a Dietary Approach to Reducing the

- Formation of Advanced Glycation Endproducts: Chemical Correlates of In Vitro Antiglycation Activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1), pp.71-77.
12. **Harvey, B., Musgrave, I., Ohlsson, K., Fransson, Å. and Smid, S.**, 2011. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits amyloid- β evoked fibril formation and neuronal cell death in vitro. *Food Chemistry*, 129(4), pp.1729-1736.
 13. **He, J. and Giusti, M.**, 2010. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), pp.163-187.
 14. **Kianbakht, S. and Hashem-Dabaghian, F.**, 2019. Antihypertensive efficacy and safety of Vaccinium arctostaphylos berry extract in overweight/obese hypertensive patients: A randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 44, pp.296-300.
 15. **Klavins, L., Kviesis, J., Nakurte, I. and Klavins, M.**, 2018. Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: Extraction optimisation and analysis. *LWT*, 93, pp.583-591.
 16. **Kosmopoulos, M., Drekolias, D., Zavras, P., Piperi, C. and Papavassiliou, A.**, 2019. Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(3), pp.611-619.
 17. **Lee, G., Jang, D., Lee, Y., Kim, J. and Kim, J.**, 2006. Naphthopyrone glucosides from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on advanced glycation end products (AGEs) formation. *Archives of Pharmacal Research*, 29(7), pp.587-590.
 18. **Li, J., Liu, D., Sun, L., Lu, Y. and Zhang, Z.**, 2012. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective. *Journal of the Neurological Sciences*, 317(1-2), pp.1-5.
 19. **Miroliaei, M., Khazaei, S., Moshkelgosha, S. and Shirvani, M.**, 2011. Inhibitory effects of Lemon balm (*Melissa officinalis*, L.) extract on the formation of advanced glycation end products. *Food Chemistry*, 129(2), pp.267-271.
 20. **Muceniece, R., Klavins, L., Kviesis, J., Jekabsons, K., Rembergs, R., Saleniece, K., Dzirkale, Z., Saulite, L., Riekstina, U. and Klavins, M.**, 2019. Antioxidative, hypoglycaemic and hepatoprotective properties of five *Vaccinium* spp. berry pomace extracts. *Journal of Berry Research*, 9(2), pp.267-282.
 21. **Omolaoye, T. and du Plessis, S.**, 2020. Male infertility: A proximate look at the advanced glycation end products. *Reproductive Toxicology*, 93, pp.169-177.

22. **Prasad, C., Davis, K., Imrhan, V., Juma, S. and Vijayagopal, P.**, 2017. Advanced Glycation End Products and Risks for Chronic Diseases: Intervening Through Lifestyle Modification. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 13(4), pp.384-404.
23. **Sadowska-Bartosz, I. and Bartosz, G.**, 2015. Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds. *Molecules*, 20(2), pp.3309-3334.
24. **Samad, N., Debnath, T., Ye, M., Hasnat, M. and Lim, B.**, 2014. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(10), pp.807-815.
25. **Siposova, K., Kozar, T., Huntosova, V., Tomkova, S. and Musatov, A.**, 2019. Inhibition of amyloid fibril formation and disassembly of pre-formed fibrils by natural polyphenol rottlerin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1867(3), pp.259-274.
26. **Song, G. and Hancock, J.**, 2010. *Vaccinium*. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, pp.197-221.
27. **Struck, S., Plaza, M., Turner, C. and Rohm, H.**, 2016. Berry pomace - a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), pp.1305-1318.
28. **Thornalley, P.**, 2003. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419(1), pp.31-40.
29. **Thornthwaite, J., Thibado, S. and Thornthwaite, K.**, 2020. Bilberry anthocyanins as agents to address oxidative stress. *Pathology*, pp.179-187.
30. **Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., Del Rio, D., Calani, L. and Conte, A.**, 2011. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chemistry*, 124(4), pp.1430-1435.
31. **Vlassara, H. and Uribarri, J.**, 2013. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both?. *Current Diabetes Reports*, 14(1).
32. **Solís-Calero, C., Ortega-Castro, J., Hernández-Laguna, A. and Muñoz, F.**, 2014. DFT study of the mechanism of the reaction of aminoguanidine with methylglyoxal. *Journal of Molecular Modeling*, 20(4).
33. 2017. Beta-Amyloid And The Amyloid Hypothesis. [ebook] Alzheimer's association, pp.1-4. Available at: <https://www.alz.org/national/documents/topicsheet_betaamyloid.pdf> [Accessed 24 April 2020].

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs “Melleņu ģints ogu spiedpalieku ekstraktu ietekme uz dziļās glikēšanas gala produktu viedošanos un beta amiloīdproteīna agregāciju in vitro” 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: Pāvels Filatovs _____
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: prof. Ruta Muceniece, Dr. habil. biol. _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents: Vadims Parfejevs, Dr.pharm _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

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)