

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

**LUNASĪNA LOKALIZĀCIJA NEIROBLASTOMAS  
ŠŪNU LĪNIJĀ SH-SY5Y**

BAKALaura DARBS

Darba autors: **Sigita Reinika**

Studenta apliecības Nr.: sr11040

Darba vadītājs: asoc. prof. Dr. Biol. Una Riekstiņa

RĪGA 2014

## ANOTĀCIJA

Lunasīns ir 43 aminoskābju garš peptīds, kam piemīt pretiekaisuma, pretvēža un holesterīna pazeminošas īpašības. Sākotnēji tas bija izdalīts no sojas pupām un vēlāk atrasts arī miežos, kviešos, rudzos, tritikālē, auzas (*Avena sativa L.*), *Solanum nigrum L.* („melnā naktene”) un amarantā.

Darba mērķis bija ar imūnofluorescences un *Western* blota metodes palīdzību noskaidrot lunasīna uzņemšanu un intracelulāro lokalizāciju neiroblastomas šūnu līnijā SH-SY5Y.

Rezultāti rāda, ka lunasīns tiek uzņemts neiroblastomas SH-SY5Y šūnās un nokļūst citoplazmā. Gan imūnofluorescences, gan *Western* blota rezultāti norāda uz primārās antivielas iespējamo nespecifisko saistību ar šūnas proteīniem.

Atslēgas vārdi: lunasīns, neiroblastomas šūnu līnija SH-SY5Y, imūnofluorescence, *Western* blots.

## ANNOTATION

Lunasin is 43-amino acid long peptide with anti-inflammatory, anti-cancer and cholesterol-reducing properties. It was originally isolated from soybeans and later found also in barley, wheat, rye, triticale, oats (*Avena sativa L.*), European black nightshade (*Solanum nigrum L.*) and amaranth.

The aim of the study was by immunofluorescence and Western blot method to find out whether lunasin up-take and localisation in neuroblastoma cell line SH-SY5Y.

Results show that lunasin was uptaken and localised in cytoplasm of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y, however were observed unspecific binding to the cellular proteins that needs to be further elucidated.

Key words: lunasin, neuroblastoma cell line SH-SY5Y, immunofluorescence, Western blot

# Saturs

APZĪMĒJUMU SARAKSTS.....	5
IEVADS .....	8
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	9
1.1. Lunasīna uzbūve.....	9
1.2. Lunasīna avoti dabā.....	10
1.3. Lunasīna efekts uz holesterīna līmeni .....	13
1.4. Lunasīna farmakoloģiskās īpašības .....	18
1.4.1. Pretaudzēju efekts .....	22
1.4.2. Pretiekaisuma efekts.....	26
2. MATERIĀLI UN METODES .....	35
2.1. Imūnofluorescences analīze .....	35
2.1.1. Šūnu fiksēšana uz priekšmetstikliņa.....	35
2.1.2. Inkubācija ar antivielām .....	35
2.1.3. Mikroskopēšana .....	36
2.2. <i>Western</i> blota analīze .....	36
2.2.1. Vielas.....	36
2.2.2. Šūnu kultūras parauga sagatavošana .....	37
2.2.3. Gēla elektroforēze un pussausā pārnese .....	37
2.2.4. Bloķēšana un blotēšana ar antivielām .....	37
2.2.5. Membrānas attīstīšana .....	38
2.2.6. Datu apstrāde.....	38
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	39
3.1. Imūnofluorescences analīze .....	39
3.2. <i>Western blot</i> analīze .....	47
4. SECINĀJUMI.....	54
PATEICĪBAS.....	55
5. IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....	56

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

BBI – Bowman – Birk inhibitors

BBIC – Bowman – Birk inhibitora koncentrāts

SDS – PAGE – denaturējoša gēla elektroforēze

KTI – Kunitz tripsīna inhibitors

LES – soja bagātināta ar lunasīnu

NO – slāpekļa oksīds

iNOS – inducējamā slāpekļa oksīda sintāze

LPS – liposaharīdi

PGE2 – prostaglandīns E2

COX-1 – ciklooksigenāze-1

COX-2 – ciklooksigenāze-2

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-2, IL-12 - interleikīni

NF- $\kappa$ B – aktivēto B šūnu kodola faktors kappa

IFN $\gamma$  – interferons gamma

NK – *natural killer cells*

PBMCs – perifēriālo asiņu mononukleāras šūnās

PBSCT – perifēriālo cilmes šūnu transplantācija

IC50 – puse maksimāli inhibējošas koncentrācijas

EC50 – puse no maksimālās efektīvās koncentrācijas

STAT4 – signāla transkripcijas un aktivācijas faktors 4

FasL – Fas ligands

CD4+, CD8+, CD3 -, CD56+, CD69+ - klusteru diferenciacijas proteīni

RGD – arginīns–glicīns–asparagīnskābe

PBS – fosfāta sāļu šķīdums

PCAF – p300/CBP – saistītais faktors

AcH3 – acetilētais histons H3

AcH4 – acetilētais histons H4

TGFβ1 – augšanas faktors beta 1

H3K9me3 – metilētais histons H3 pie lizīna 9

HMG–CoA reduktāze – 3 – hidroksil – 3 metil – glutarilkoenzīma A reduktāze

CoA – koenzīms A

mRNS – mesendžera RNS

siRNS – mazais interefērejošais RNS

SPI – sojas proteīna izolāts

SPI + H – sojas proteīna izolāts + hidrolizāts

ĻZBL – ļoti zema blīvuma lipoproteīni

ZBL – zema blīvuma lipoproteīni

ABL – augsta blīvuma lipoproteīni

HDI – sojas proteīna koncentrāts bagātināts ar izoflavoniem

ACC – acetilkoenzīma A karboksilāze

PPAR – peroksisomu proliferāciju aktivizētie receptori

SREBPs – sterīnu regulējama elements, kas saistās ar olbaltumvielām

FAS – taukskābju sintāze

HAT – histonu acetiltransferāze

HDAC - histonu deacetilāze

LEB – mieži bagātināti ar lunasīnu

CCND1 – ciklīns D1

CDK4 – ciklīna atkarīga kināze 4 vai šūnu dalīšanās proteīnkināze 4

p21 – ciklīna atkarīgas kināzes inhibitors 1

p15INK4b – ciklīna atkarīgas kināzes 4 inhibitors B

BFA – brefeldīns A

Ca – kalcijs

rH4 – rekombinantais histons H4

E1A – *adenovirus early region*

E1A–CR1 – *adenovirus early region CR 1 domen*

DMBA – 7, 12 – dimetilbenzenantracēns

E2F – ir grupa gēnu, kas kodificē transkripcijas faktorus augstākas pakāpes eikariotiem

NADH – nikotīnamīda adenīdinukleotīds

yGCN5 – rauga transkripcijas koaktivators GCN5

PTEN – fosfatāzes un tensīna homologs

p53 – 53 kDa kodola fosfoproteīns

THBS1 – trombospondīns 1

HIF1 $\alpha$  – hipoksijas inducējošais faktors alfa 1

PRKAR1 $\alpha$  – cAMP atkarīga proteīnkināzes tips 1 alfa

TOB–1, ANP32A – proteīnu kodējošie gēni

MCA – ķīmiskais kancerogēns

## IEVADS

Lunasīns ir 43 aminoskābju garš peptīds, ko 1996.g. nejauši atklāja sojas pupās Alfredo Galvezs *Dr. de Lumen 's UC Berkeley* laboratorijā, mēģinot uzlabot sojas proteīna īpašības (Galvez et. al., 1999). Līdz ar to lunasīns ir pavisam jauns sojas proteīns, un tā īpašības tiek aktīvi pētītas. Ir jau pierādīts, ka lunasīnam piemīt pretvēža un pretiekaisuma īpašības, tāpat zinātnieki domā, ka lunasīnam piemīt holesterīna samazinošs efekts. Pagaidām eksperimentos ir pierādīta tikai pretvēža un pretiekaisuma iedarbība, un arī tikai uz dzīvniekiem. Plaši pētījumi pagaidām uz cilvēkiem vēl nav veikti. Eksperimentos lunasīnam ir pierādīta pretvēža darbība *in vitro* vēža šūnu kultūrās citotoksicitātes testā un profilaktisko darbību ķīmisko kancerogēnu izraisīto zīdītāju šūnu transformāciju modelī, kā arī pret melanomas aktivitāti *in vivo* peļu modelī (de Mejia & Dia, 2009).

Pateicoties šīm īpašībām tālākā nākotnē cerams, ka lunasīns būs ļoti labs līdzeklis pret vēzi un iekaisumu, un, iespējams, arī pret aptaukošanos. Iespējams, ka pat nākotnē lunasīns aizvietos statīnus, kas ir šobrīd pazīstamākās holesterīna samazinošas zāles. Protams, vispirms jāveic būs diezgan daudz pētījumu uz cilvēkiem, lai noskaidrotu, kādas blakusparādības tiks novērotas lunasīna lietošanas laikā.

Darba mērķis bija noskaidrot, vai lunasīns tiek uzņemts neiroblastomas SH-SY5Y šūnās un noteikt tā intracelulāro lokalizāciju.

Darba uzdevumi:

1) apgūt imūnofluorescences metodi, lai izpētītu, kur lunasīns lokalizējas neiroblastomas šūnu līnijā SH-SY5Y;

2) apgūt *Western* blota metodi, lai apstiprinātu lunasīna uzņemšanu neiroblastomas SH-SY5Y šūnās.

Darbs sastāv no literatūras apskata, materiālu un metožu, rezultātu analīzes un diskusijas nodaļām.

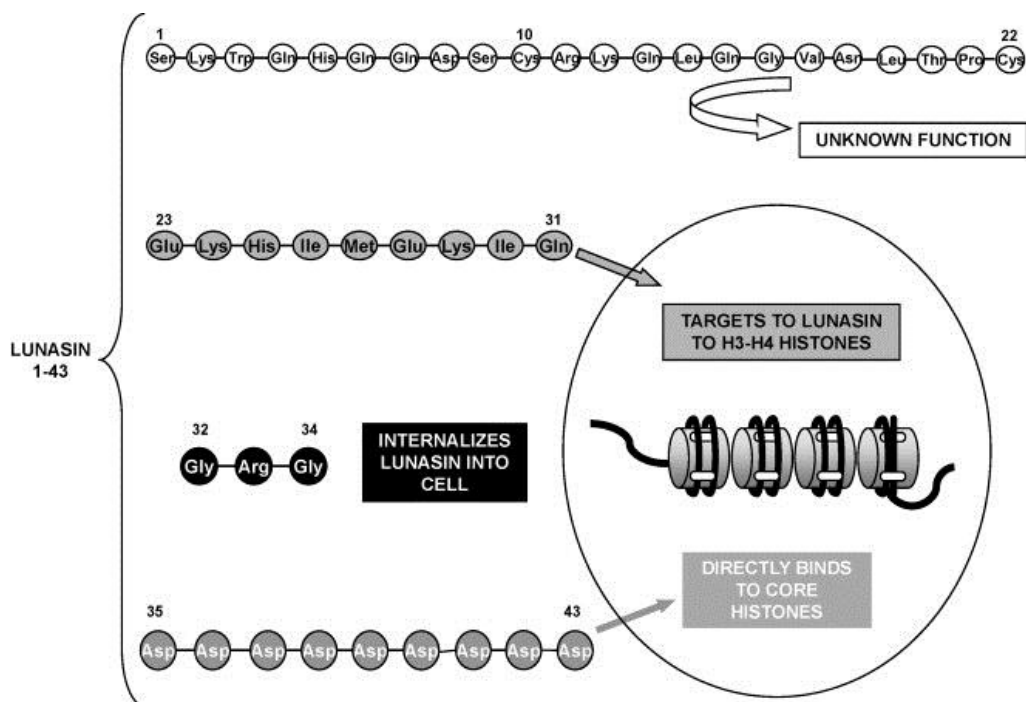
Darbā ir izmantoti zinātniskie raksti un ziņojumi, kas iegūti no Latvijas Universitātes bibliotēkā pieejamajiem brīvpieejas e – resursiem, ārzemju zinātnisko žurnālu publikācijām un dažādu medicīnas iestāžu un organizāciju mājas lapām. Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmācijas studiju programmā, izmantojot Valsts nozīmes pētījumu centra Farmācijā un biomedicīnā iekārtas.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Lunasīna uzbūve

Lunasīns ir 43 aminoskābju ķēdīti saturošs peptīds SKWQHQQDSCRKQGVNLTPC–EKHIMEKIQG–*RGD*–DDDDDDDD, kura struktūra atgādina hromatīna – saistošo proteīnu konservatīvo rajonu (Park et. al., 2005; Galvez et al., 2001; Galvez&,-de Lumen, 1999; Galvez et. al., 1997). Lunasīnu atklāja nejauši, izmēģinot šūnu transfekciju ar dažādu sojas proteīnu un peptīdu gēniem. Izrādījās, ka lunasīna gēna ekspresija izraisa mitozes bloķēšanu un šūnu nāvi (Park et.al., 2005; Galvez et. al., 2001; Galvez&,-de Lumen, 1999, Galvez et. al., 1997). Lunasīns satur 8 asparagīnskābes atlikumus, kas ir atbildīgi par lunasīna antimitotisko efektu, pēc tam, kad tas sasaistījies ar hipoacetilētu hromatīna reģionu, kā, piemēram, centromērās. Tā rezultātā izveidojas kinetohora komplekss, kas tad arī neļauj mikrotubuļiem pievienoties pie centromērām, kas beigas noved pie mitozes apstāšanās un galu galā pie šūnu nāves (Galvez&,-de Lumen, 1999). Lunasīns satur arī šūnu adhēzijas motīvu Arg–Gly–Asp (*RGD*), kā zināms, šīs motīvs atļauj lunasīnam pieķerties pie ārpusšūnas matricas (Rouslahti&,-Pierschbacher, 1986), un veido spirāli, kas saglabā hromatīna saistošo proteīnu reģionu (de Lumen et. al., 2009).

Lunasīns ir termostabils, un pat vārot 10 minūtes, tā struktūra un bioaktivitāte nemainās (Park et. al., 2005). Lunasīna ķēdes garums, tā sekvenču un katra fragmenta aktivitāte ir, parādīta attēlā 1.1.



1.1.att. Lunasīna aminoskābju secība un parādīta tā dažādo fragmentu aktivitāte. Lunasīns ir 43 aminoskābju garš peptīds. Fragmenti f (23 – 34) saistā lunasīnu ar hromatīnu. Arg–Gly–Asp motīvs [f (23 – 41)] ir atbildīgs par lunasīna internalizāciju šūnas kodolā. Poli–aspartilgals [f (35 – 43)] ir atbildīgs par to tiešo saistīšanos ar hromatīnu (Ledesma et. al., 2009)

## 1.2. Lunasīna avoti dabā

Lunasīns ir atklāts sojas pupās, miežos, kviešos, rudzos, tritikāles, auzas (*Avena sativa L.*), *Solanum nigrum L.* („melnā naktene”) un amaranta (De Lumen, 2005; Jeong et. al., 2010; Nakurte et. al., 2012; Kirhnere et. al., 2013; Barba de la Rosa et. al., 2008).

Noskaidrots, ka lunasīns sāk sintezēties sojas sēklu aizmetņos 5 nedēļas pēc noziedēšanas, saglabājas nobriedušās sēklās arī no sojas pupām iegūtos miltos. Lunasīna līmenis mainās atkarībā no auga audzēšanas temperatūras, augsnes un mitruma. Tas norāda, ka lunasīna līmeni sojas pupās var mērķtiecīgi palielināt. Eksperimentā, kur salīdzināja BBI (Bowman – Birk inhibitors), izoflavonu un lunasīna līmeņa svārstības auga dziedēšanas gaitā, noskaidroja, ka lunasīns parādās sēklu aizmetņos un to līmeņi palielinās sēklām nobriestot. Tāpat šī eksperimentā ietvaros noskaidroja, ka pārmērīgs mitrums neveicina lunasīna sintēzi sojā, bet gaismai un vai tumsai ietekme ir maza (Park et. al., 2005; de Lumen, 2005; Wang et. al., 2008).

Ir noskaidrots, ka lunasīna koncentrācija produktos ir atkarīga no sojas šķirnes, vides faktoriem un arī no temperatūras (Wang et. al., 2008). Lunasīna saturs tika izpētīts 5 dažādas

auzu šķirnes: „Laima”, „Arta”, „Stendes Līva” (Latvija), „Ivory” (Vācija) un „S-156” (Latvija) no 2010. un 2011. gadā ražam (Nakurte et. al., 2013). Lai noteiktu lunasīna daudzumu paraugos tika izmantota šķidrums hromatogrāfija un masspektometrija. Visvairāk lunasīns bija sastopams „Ivory”, selekcijas līnija „S-156” un „Arta” (Nakurte et. al., 2013). Lunasīna saturs „Ivory” auzu šķirne gan 2010., gan 2011. gadā raža bija vienāds. Toties 2011. gadā raža novēroja, ka lunasīna daudzums ir samazinājies auzu šķirnes „Laima” un „Stendes Līva”, un tikai neliels lunasīna pieaugums bija novērojams šķirnes „Arta” un selekcijas līnija „S-156” (Nakurte et. al., 2013). Lunasīna satura vidējās vērtības dažādas auzu šķirnes ir, redzams tabula 1.1.

Tabula 1.1.

**Lunasīna satura vidējās vērtības auzu genotipos (šķirnes) (Nakurte et. al., 2013)**

Nr.	Genotips (šķirnes)	Lunasīna saturs mg/g graudos	
		2010	2011
1.	Laima	0,081 ± 0,005	0,034 ± 0,002
2.	Arta	0,084 ± 0,003	0,117 ± 0,04
3.	Stendes Līva	0,064 ± 0,007	0,056 ± 0,003
4.	Ivory	0,197 ± 0,010	0,195 ± 0,009
5.	S - 156	0,091 ± 0,005	0,117 ± 0,004

Noskaidroja, ka lunasīna sastāva ir heteroatomī, kas palīdz lunasīnam saistīties ar proteīniem elektroizsmidzināšanas procesa laikā (Nakurte et. al. 2013).

Lunasīna saturs ekstraktos, kas iegūti no dažādām sēklām, graudiem, un augu izcelsmes ārstniecības augiem ir parādīts tabula 1.2. Šie dati norāda uz to, ka sojas genotipam ir nozīmīga ietekme uz lunasīna koncentrāciju, līdz ar to arī lunasīna līmenis sojā var tikt ģenētiski modificēts. Tāpat arī sēklu attīstības un dīgšanas posmi ietekmē lunasīna koncentrāciju sojā (Park et. al., 2005). Lunasīna daudzums ievērojami palielinās sēklu nogatavošanās laikā. Gaisma un tumsa neietekmē lunasīna koncentrāciju augos, bet mitrums, temperatūra būtiski ietekmēja lunasīna koncentrāciju (Park et. al., 2005; Wang et. al., 2008).

Kad tika analizēts vai lunasīns ir sastopams austrumu izcelsmes ārstniecības augos, noskaidroja to, ka lunasīns bija sastopams gandrīz visos nakteņu dzimtas augos (*Solanaceae*), izņemot *L. chinensis* (Jeong et. al., 2007).

Lunasīna saturs ekstraktos, kas iegūti no dažādām sēklām, graudiem un augu izcelsmes ārstniecības augiem (Ledesma et. al., 2009)

Auga latīniskais nosaukums	Auga parastais nosaukums	Lunasīna saturs	
		mg lunasīns/g proteīns	mg lunasīns/g sēkla
<i>Glycine max</i>	Soja	4,4 – 70,5	0,5 – 8,1
<i>Hordeum vulgare</i>	Mieži	5,9 – 8,7	0,01 – 0,02
<i>Triticum vulgare</i>	Kvieši	-	0,2 – 0,3
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Amarants	9,5 – 12,1	-
<i>Solanum nigrum L.</i>	„Melnā naktene”	36,4	1,8
<i>Solanum lyratum</i>	Hyyodori – jogo (Japāņu vārds)	22,3	0,4
<i>Physalis alkekengi var. Franchezi</i>	Ziemas ķirsis	17,0	0,1
<i>Datura stramonium</i>	„Sātana sēkla”	10,3	0,3

Lunasīns ir atrasts 9 miežu genotipos (šķirnes), kas ir parādīti tabula 1.3. Visām šķirnēm lunasīna daudzums ir dažāds. Augstākais lunasīna saturs ir *cv. Salrok* (99,0 µg lunasīna/g sēklas), bet viszemākais lunasīna saturs ir *cv. Nonghwa* (12,7 µg lunasīna/g sēklas) (Hsieh et. al., 2010).

**Lunasīna saturs miežu genotipos (šķirnes) (Hsieh et. al., 2010)**

Šķirnes	Proteīni (μg/ml)*	Lunasīns (ng/μg proteīna)*	Lunasīns (μg/g sēklas)*
<i>Hordeum vulgare L.</i>			
<i>cv. Kunkang</i>	1,89 ± 0,19	6,2 ± 0,9	46,9 ± 2,2
<i>cv. Dahyang</i>	2,56 ± 2,20	6,2 ± 0,7	63,8 ± 3,6
<i>cv. Dasong</i>	2,50 ± 2,00	3,1 ± 0,6	30,7 ± 1,9
<i>cv. Nonghwa</i>	2,83 ± 2,60	1,1 ± 0,2	12,7 ± 0,9
<i>cv. Salrok</i>	2,87 ± 2,90	8,6 ± 1,1	99,0 ± 4,3
<i>cv. Olbori</i>	2,49 ± 2,00	5,3 ± 0,8	52,5 ± 3,9
<i>cv. Teapyung</i>	2,25 ± 2,10	7,6 ± 1,0	68,2 ± 4,2
<i>cv. Taegang</i>	1,93 ± 1,90	2,4 ± 0,5	18,4 ± 1,1
<i>cv. Heanchal</i>	2,25 ± 2,30	3,2 ± 0,6	23,9 ± 0,8

\*Vērtības ir vidējās ± standartnovirze, ko noteica pēc trim mērījumiem.

### 1.3. Lunasīna efekts uz holesterīna līmeni

Lai gan tirgū ir sastopami daudzi bioaktīvi dabas produkti, kas pretendē uz holesterīna līmeņa samazinošo efektu, daudziem no šiem produktiem trūkst zinātnisku pierādījumu un tāpat nav noskaidrots to iedarbības mehānisms, lai pamatotu to efektu. Jaunākie fakti liecina par to, ka sojas peptīds lunasīns ir galvenais sojas proteīna komponents, kas ir atbildīgs par holesterīna samazinošo efektu. Arvien vairāk pētījumu liecina par to, ka peptīds lunasīns ir saistīts ar sirds un asinsvadu slimībām. Lielākā daļa holesterīna tiek ražots aknās ar HMG-CoA (3 – hidroksi – 3 – metil – glutarilkoenzīms A) reduktāzes gēna palīdzību. Statīni pārsvara bloķē HMG-CoA reduktāzi, bet tie bieži vien var nobloķēt pārāk daudz holesterīna. Kas beigas var novest pie nopietnām blakusparādībām, bet cilvēkam, tomēr ir nepieciešams noteikts daudzums holesterīna, lai nodrošinātu pareizu šūnu funkciju darbošanos, ka, piemēram, saglabāt šūnu membrānas integritāti un hormonu ražošanu. Saskaņā ar Galvez izteikto secinājumu lunasīns darbojas atšķirīgi, to ir paredzēts dot agrākā posmā, nekā statīnus, un līdz ar to lunasīns arī pilnība nebloķē HMG-CoA reduktāzes darbību. Lunasīns demonstrē izcilu darbību sirds un asinsvadu slimības un tāpat uzrāda labas pretiekaisuma īpašības (Janet Poveromo, 2012, Pieejams internetā: <http://www.soylabs.com/Portals/0/NIE%20Cholesterol%20Article.pdf>).

Soja ir augu valsts augs, kurš visvairāk ir sastopamas olbaltumvielas. Olbaltumvielu saturs sojā svārstās no 36% līdz 56% (Grieshop et. al., 2003; Grieshop&,-Fahey, 2001; Garcia et. al., 1997; Haytowitz&,-Mathews, 1986). Proteīna saturs sojā dažādās teritorijas kvantitatīvi atšķiras. Soja, kas ir audzēta Amerikas dienvidu daļa, ir vairāk sastopams neapstrādāto vai neattīrīto proteīnu saturs (Grieshop et. al., 2003). Proteīnu un aminoskābju saturs atšķiras sojā starp valstīm un pilsētām (Grieshop&,-Fahey, 2001). Dominējošas olbaltumvielas sojā ir 7S globulīns (konglicīns) un 11S globulīns (glicīns), tie veido apmēram 80% no visu sojas proteīnu sastāva (Garcia et. al., 1997). Sojā satur arī citus proteīnus, ka, piemēram, 2S, 9S un 15S. Tāpat arī soja satur lecitīnu un proteāzes inhibitorus, kā, piemēram, Bowman – Birk inhibitoru (BBI) un Kunitz tripsīna inhibitoru (KTI) (Haytowitz&,-Mathews, 1986).

Tiek uzskatīts, ka sojas proteīni satur lielāko daļu svarīgas aminoskābes, kas ir atrodamas dzīvnieku izcelsmes proteīnos. Sojas proteīnu uzturvērtība ir aptuveni līdzvērtīga dzīvnieku proteīniem ar augstu bioloģisko aktivitāti (Young, 1991). Tāpat sojas proteīni ir saistīti ar taukskābēm, saponīniem, izoflavoniem un fosfolipīdiem. Sojā vispirms atrada A un B grupas saponīnus kopā ar to prekursoru vai aglikonu. B grupas saponīni ir 4 reizes vairāk sastopami sojas sēklas, nekā A grupas saponīni (Berhow et. al., 2006). Saponīnu saturs dažādās sojas šķirnes svārstās no 13 – 42 mikromoli/g dīglī un no 3 – 6 mikromoli/g dīgļlapas (Hubert et. al., 2005). Izoflavonu daudzums sojā ir atkarīgs no sojas veidā, ģeogrāfiska apgabala, kura audzē un ražas gadā (Wang&,-Murphy, 1994; Wang&,-Murphy, 1994; Caldwell et. al., 2005; USDA-Iowa State University database on the isoflavones contents of foods. Pieejams internetā: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/data/isoflav.html>). Turklāt izoflavonu saturs dažādos sojas produktos atšķiras arī pēc to apstrādes metodes (Wang&,-Murphy, 1994). Soja un komerciāli pieejami sojas produkti satur aptuveni 0,1 – 0,5 mg izoflavona/g olbaltumvielas (Wang&,-Murphy, 1994; Caldwell et. al., 2005).

Pētījumā novēroja sojas proteīnu ietekmi uz ķermeņa svaru, plazmas un aknu triacilglicerolu koncentrāciju un lipogenisko enzīmu gēnu ekspresiju aknās. Eksperiments tika veikts uz aptaukojušajām Wistar žurkām (Iritani et. al., 1996). Wistar žurkas 3 nedēļas tika barotas ar kazeīnu, vai sojas proteīnu, kas saturēja hidroģenētus taukus (4% hidroģenētu tauku + 1% kukurūzas eļļa), vai kukurūzas eļļu (5%). Pēc 3 nedēļu barošanas, žurkās, kas tika barotas ar sojas proteīnu bija novērojams mazāks ķermeņa svars, nekā žurkām, kuras baroja ar kazeīnu. Arī plazmā un aknās triacilglicerolu koncentrācija bija mazāka žurkām, kuras baroja ar sojas proteīnu, nekā žurkām, kuras baroja ar kazeīnu. Turklāt, mesendžera RNS (mRNS) un lipogenisko enzīmu darbība bija zemāka žurkām, kuras baroja ar sojas proteīnu, nekā žurkām,

kuras baroja ar kazeīnu, tas nebija atkarīgs no genotipa un tauku satura (Velasquez&,-Bhathena, 2007).

Tālāk tika pārbaudīta dažādu taukskābju un olbaltumvielu ietekme uz glikozi un insulīna receptoru gēnu ekspresiju uz Wistar žurku tēviņiem (Iritani et. al, 1997). Šajā eksperimentā 3 nedēļas žurkām tika dots kazeīns vai sojas proteīns, kas saturēja 9% daļēji piesātinātus liellopu taukus (+ 1% kukurūzas eļļa), 10% kukurūzas eļļu un 10% zivju eļļu. Plazmā insulīna koncentrācija bija ievērojami lielāka žurkām, kuras baroja ar kukurūzas eļļu un zivju eļļu, nekā žurkām, kurām deva kazeīnu vai sojas proteīnu. Tomēr plazmā glikozes koncentrācija būtiski neietekmēja tauku un olbaltumvielu saturu. mRNS insulīna koncentrācija aknās un taukaudos bija augstākā žurkām, kuras baroja ar sojas proteīnu, nekā žurkām, kuras baroja ar citiem proteīniem. Līdz ar to var izteikt teoriju, ka sojas proteīnam piemīt pretaptaukošanās efekts un tas spēj samazināt insulīna rezistenci, bet tikai tad, ja sojas proteīns satur polinesātinātas taukskābes (Velasquez&,-Bhathena, 2007).

Noskaidroja, ka Sprague–Dawley žurkas, kas bija barotas ar sojas proteīna izolātu (SPI) un tā hidrolizātu (SPI + H) ievērojami zemāks bija ķermeņa tauku saturs un glikozes līmenis plazmā, nekā žurkām, kuras baroja ar kazeīnu. Kopējais holesterīna līmenis plazmā bija zemāks žurkām, kuras baroja ar sojas proteīna hidrolizātu, nekā žurkām, kuras baroja ar kazeīnu (Aoyama et. al., 2000). SPI un tā hidrolizāts samazināja ķermeņa svaru un nierēs fibrozo tauku spilventiņu saturu žurkās, salīdzinot ar grupu, kur tika dots tikai proteīna izolāts (Fukui et. al, 2000).

Arī tika izvērtēts sojas proteīna izolāts (SPI), kurš saturēja maz kaloriju, ietekme uz ķermeņa tauku sastāvu, plazmas glikozi, lipīdiem, adiponektīna līmeni. Pētīja SPI ietekmi uz gēnu ekspresiju, kas ir saistīta ar glikozi un taukskābju metabolismu. Eksperiments notika uz KK–Y peļu tēviņiem. Pelēm, kuras tika barotas ar SPI novēroja, ka ir samazinājies ķermeņa svars un taukaudi, tāpat arī plazmā holesterīns, triglicerīdi un glikozes līmenis bija samazinājies (Nagasawa et. al., 2002).

Cilvēkiem, kuriem bija liekais svars, izvērtēja īstermiņa un ilgtermiņa mazkaloriju pārtiku, kas saturēja olbaltumvielas, ietekmi uz cilvēka ķermeņa svaru un plazmas lipīdiem. Pētījumā piedalījās 24 cilvēki, kam bija liekais svars, vecuma no 25 – 42 gadi, cilvēkus sadalīja pa divām grupām: viena daļa cilvēku saņēma kazeīnu, bet otra daļa saņēma sojas proteīnu. Sākumā pacienti 15 dienas pēc kārtas saņēma 375 kcal/dienā, bet turpmākajās 60 dienās tie saņēma 425 kcal/dienā. Abās grupās pacientiem varēja novērot ķermeņa svara samazināšanos (Bosello et. al., 1998). Kopējais plazmas holesterīna, L<sub>1</sub>ZBL (ļoti zema blīvuma lipoproteīni), ZBL (zema blīvuma lipoproteīni) holesterīna līmenis samazinājās abās grupās, bet, ja skatās procentuāli, tad sojas proteīna grupā bija vairāk samazinājies, nekā

kazeīna grupā. Plazmā triglicerīdi bija samazinājušies grupā, kas saņēma sojas proteīnu, bet grupas, kas saņēma kazeīnu nebija novērojams triglicerīdu samazinājums plazmā. Šie rezultāti liecina par to, ka pacienti, kas lieto pārtiku, kas satur soju nāk tikai par labu veselībai, jo palīdz samazināt holesterīna līmeni organismā (Bosello et. al., 1998).

Noskaidroja, ka cilvēkiem, kuri saņēma mazkaloriju sojas saturošu maltīti bija novērojams liels ķermeņa tauku masas, kopējais holesterīna un ZBL holesterīna daudzuma samazinājums, salīdzinot ar kontroles grupu (Allison et. al., 2003).

Mehānisms, ar kura palīdzību sojas olbaltumvielas var realizēt labvēlīgo ietekmi uz aptaukošanos vēl nav īsti skaidrs. Toties daži pierādījumi liecina, ka sojas proteīni var labvēlīgi ietekmēt lipīdu absorbciju, insulīna rezistenci, taukskābju metabolismu un citas hormonālās, šūnu, vai molekulārās izmaiņas, kas saistītas ar aptaukošanos (Valequez&,-Bhathena, 2007).

Ir labi zināms, ka sojas proteīns samazina kopējo ZBL holesterīna un triglicerīdu daudzumu serumā, kā arī tas samazina aknu holesterīna un triglicerīdu daudzumu (Valesquez&,-Bhathena, 2007). Tāpat ir pierādīts, ka sojas proteīns samazina holesterīna metabolismu aknās un ZBL receptoru darbību (Lovati et. al., 1985; Manzoni et. al., 2005; Kirk et. al., 1998). Viena no eksperimentiem, kas tika veikts uz Zucker žurkām, kuras baroja ar sojas proteīna koncentrātu, kas bija bagātināts ar izoflavoniem (HDI) pēc 6 nedēļām novēroja, ka aknās tauku līmenis un plazmā alanīna transamināzes un aspartāta aminotransamināzes līmenis bija samazinājies (Gudbrandsen et. al., 2006). Šis efekts papildinās ar to, ka tas palielina mitohondriju, peroksimālo beta – oksidēšanu, acetilkoenzīma A karboksilāzes, taukskābju sintēzes un glicerīna 3 – fosfāta aciltransferāzes darbību aknās, tāpat tiek palielināts triacilglicerolu līmenis plazmā un tiek samazināts L<sub>ZBL</sub> mRNS receptoru līmenis. Tomēr L<sub>ZBL</sub> receptoru gēnu ekspresijas samazinājums nebija novērojams žurkām, kuras baroja ar HDI, kas norāda uz to, ka aknās ir galvenais orgāns, kas atbild par lipoproteīniem, kuri ir bagāti ar triacilgliceroliem. Līdz ar to, var secināt, ka sojas proteīna holesterīna pazeminošais efekts darbojas caur dažādiem darbības mehānismiem, kas regulē uzsūkšanos un metabolismu (Valesquez&,-Bhathena, 2007).

*In vivo* ir pierādīts, ka sojas proteīns var ietekmēt lipoģenēzi aknās. Pētījumos ar žurkām ir pierādīts, ka sojas proteīns samazina triglicerīdu daudzumu plazmā, bet, jo īpaši aknās (Iritani et. al., 1986). Acetilkoenzīma A karboksilāze (ACC) ir galvenais enzīms, kas atbild par taukskābju biosintēzi (Dyck et. al., 2000). Tāpat ir pierādīts, ka sojas proteīna izolāts (SPI) samazināja ACCa un ACCb izoformās mRNS un proteīnu saturu aknās (Xiao et. al., 2006).

Ir arī eksperimentāli pierādījumi, kas liecina par to, ka sojas proteīni uzlabo insulīna rezistenci un lipīdu līmeni, aktivizējot peroksisomu proliferāciju aktivizētos receptorus

(PPAR), kas ir kodola transkripcijas faktori, kas regulē gēnu darbību un ir iesaistīti glikozes homeostāzes uzturēšanas procesā, lipīdu metabolisma un taukskābju oksidācija (Mezei et. al., 2003; Morifuji et. al., 2006). Ir pierādīts, ka augsts izoflavonu saturs sojas proteīnos uzlabo glikozes toleranci, insulīna rezistenci, aknu holesterīna un triglicerīdu koncentrāciju Zucker žurkās, kam ir liekais svars (Mezei et. al., 2003). Eksperimenti uz šūnu kultūrām parādīja, ka izoflavoni, kas satur sojas ekstraktu, un sojas izoflavoni palielināja PPAR gēnu ekspresiju, kas liecina par to, ka sojas proteīns labvēlīgi ietekmē glikozes un lipīdu metabolismu, ko pastiprina PPAR aktivizēšana (Valesquez&,-Bhathena, 2007).

Sojas proteīns var samazināt aptaukošanos caur sterīnu regulējamo elementu, kas saistās ar olbaltumvielām (SREBPs), tas ir no transkripcijas faktoru saimes, kas kontrolē vairākus gēnus, kas ir iesaistīti taukskābju un holesterīna sintēze. Eksperimentā gaitā novēroja, ka Zucker fa/fa žurkās, kas bija barotas ar sojas proteīnu, samazināja aknās SREBP-1 (galvenais regulators, kas atbild par taukskābju biosintēzi aknās) ekspresiju, tāpat tika samazināta to mērķa orgānu darbība, ka, piemēram, taukskābju sintāzes (FAS), sterolCoA–desaturāzes, delta–5 un delta–6 desaturāzes (Tovar et. al., 2005). Novēroja, ka sojas proteīns ievērojami samazināja holesterīna un triglicerīdu daudzumu aknās neskatoties uz to, ka žurkām bija hiperinsulinēmija. Šie rezultāti liecina par to, ka sojas proteīns samazina SREBP–1 ekspresiju aknās caur insulīna neatkarīgiem mehānismiem (Valesquez&,-Bhathena, 2007).

Vēl viens darbības mehānisms caur, kuru varētu darboties sojas proteīns ir caur to, ka tas stimulē adiponektīnu, citokīnus, kas ražo tauku šūnās, kam ir diezgan būtiska lomā tajā, ka tas regulē adipocītu diferenciāciju un sekrēciju, un uzlabo arī insulīna sensitivitāti (Lihn et. al., 2005; Fu et. al., 2005; Dietze–Schroeder et. al., 2005).

Ir noskaidrots, ka saponīni, kas atrodas sojā samazina holesterīna līmeni serumā (Oakenfull, et. al., 1984), bet to lomā taukskābju metabolismā gan vēl nav skaidra (Valesquez&,-Bhathena, 2007). Vienā pētījuma Sīrijas kāmjēm tika dota pārtika, kas saturēja B grupas sojas saponīnus (bez izoflavoniem) un pēc kāda laika novēroja, ka kopējais holesterīna līmenis plazmā ir samazinājies, bet tikai ne ABL (augsta blīvuma lipoproteīni) līmenis (Lee et. al., 2005). Šīs izmaiņas ir saistītas ar to, ka pastiprināti izdalās žultskābē un neitrāli sterīni, kas liecina par to, ka B grupas sojas saponīni samazina lipīdu daudzumu plazmā caur mehānismu, kas ir atbildīgs par žultskābes un neitrālo sterīnu izdalīšanos (Valesquez&,-Bhathena, 2007).

Fosfolipīdi, kas atrodas sojas proteīna varētu būt daļēji atbildīgi par antilipidēmisko efektu. Eksperimentā novēroja, ka žurkām, kuras tika barotas 3 dienās ar sojas fosfolipīdiem novēroja, ka ievērojami samazinājās taukskābju sintēzes, ābolskābes enzīma, glikozes 6 – fosfāta dehidrogenāzes un piruvāta kināzes darbība aknās (Rouyer et. al., 1999). Žurkās, kas

tika barotas ar sojas proteīna peptisko hidrolizātu varēja novērot krietni vien lielāku holesterīna daudzumā samazināšanos serumā, tāpat arī kopēja lipīda un holesterīna daudzuma samazināšanos aknās, nekā ar tam žurkām, kuras tika barotas, vai nu tikai ar sojas proteīnu, vai sojas proteīna hidrolizātu (Nagaoka et. al., 1999).

Tāpat sojas proteīna pretaptaukošanās efekts var būt saistīts ar izoflavoniem, jo ir pierādīts, ka izoflavoni samazina tauku uzkrāšanos noteiktos reģionos (Ali et. al., 2004; Banz et. al., 2004; Manzoni et. al., 2005). Dažos pētījumos ir pat pierādīts, ka sojas ekstrakti, kas saturēja izoflavonus, un sojas izoflavoni, genisteīns un dadzeīns, paaugstināja PPAR–alfa un PPAR–gamma pastiprināto gēnu ekspresiju. Turklāt, sojas izoflavoni arī palielināja SREBP–1 un SREBP–regulēto gēnu HepG2 šūnu darbību (Mullen et. al., 2004). Noskaidroja arī, ka sojas izoflavoni palielina HMG–CoA reduktāzes darbību. Līdz ar to var secināt, ka izoflavoni regulē holesterīna biosintēzi un homeostāzi (Valesquez&,-Bhathena, 2007).

Tādējādi, var secināt, ka dažiem polipeptīdiem (piemēram, 7S globulīns vai konglicīns), saponīniem, fosfolipīdiem un izoflavoniem (genisteīns un dadzeīns), kas atrodas sojā piemīt holesterīna samazinošs efekts, kas var būt turpmāk labs līdzeklis, lai samazinātu aptaukošanos, kas ir diezgan izplatīta problēma mūsdienās (Valesquez&,-Bhathena, 2007).

Pēc šiem visiem secinājumiem un rezultātiem arī var secināt, ka, iespējams, arī lunasīnam var piemist holesterīna samazinošs efekts, jo lunasīns, tāpat, ka iepriekš pieminētie savienojumi ir atrodams sojā.

#### **1.4. Lunasīna farmakoloģiskās īpašības**

Pelēm, žurkām un cilvēkiem ir pierādīta orālā lunasīna biopieejamība. Lunasīns internalizējas šūnās minūšu laikā, bet kodolā lokalizējas apmēram 18 stundu laikā. Šūnas kodolā lunasīns inhibē histonu acetilēšanos un, sabojājot histonu acetilēšanās/deacetilēšanās dinamiku, izraisa šūnu apoptozi. Uz šo defektu vispirms reaģē ātri augošas šūnas, kādas ir vēža šūnas (Park et. al., 2007; Jeong et. al., 2007; Kim et. al., 2007).

Lunasīnam ir pierādīta pretvēža darbība *in vitro* vēža šūnu kultūrās citotoksicitātes testā un profilaktisko karcinogēnu izraisīto zīdītāju šūnu transformāciju modelī, kā arī pret melanomas aktivitāti *in vivo* peļu modelī. Bez tam lunasīnam piemīt arī pretiekaisuma darbība, jo tas ievērojami samazina dažādu iekaisuma marķieru līmeni (de Meija&,-Dia, 2009).

Pētījumā noskaidroja, ka attīrīts lunasīns inhibē yGCN5 (rauga transkripcijas koaktivators GCN5) aktivitāti par 26% un 60% pie koncentrācijām 50 nM un 1000 nM,

kamēr PCAF aktivitāti inhibē par 28% un 43% pie koncentrācijām 50 nM un 1000 nM. Lunasīns sākot ar koncentrāciju 100 nM sāka inhibēt yGCN5 aktivitāti, bet PCAF aktivitātes inhibīcija bija novērojama jau sākot ar koncentrāciju 50 nM (Hsieh et. al., 2010).

Pēc 7 nedēļām sēklās bija novērojams lunasīns, kuram bija novērojama ietekme uz HAT (histonu acetiltransferāze) darbību, līdz ar to, ka bija ietekme uz HAT, tika kavēta PCAF un yGCN5 aktivitāte par 23% un 33%. Pēc 8 nedēļām atkal tika novērota ietekmē uz HAT darbību un, ka jau iepriekš tika pieminēts arī kavēja PCAF un yGCN5 aktivitāte par 43% un 59% (Hsieh et. al., 2010).

Kā jau zināms lunasīnam piemīt unikāla spēj internalizēties šūnā un lokalizēties tieši kodolā (Galvez et. al., 2001; de Lumen, 2005; Lam et. al., 2003). Lunasīns, kas bija attīrīts no miežu sēklām internalizējas peļu fibroblasta NIH3T3 šūnās un lokalizējas kodolā 20 h pēc lunasīna ievadīšanās (Hsieh et. al., 2010).

Lunasīns tika atrasts žurku nierēs un aknās pēc tam, kad tas tika barotas ar LEB (mieži bagātināti ar lunasīnu), to vidējās koncentrācijas bija 32,8 µg/g nierēs un 3,5 µg/g aknās. Turpretī asinīs lunasīns netika novērots. Lunasīns, kas attīrīts no miežiem internalizējas žurku nierēs un aknās, pēc tam, kad tas bija barotas ar LEB. Lunasīns, kas attīrīts no žurku nierēm un aknām inhibē yGCN5 aktivitāti apmēram par 20% un 18%, un PCAF aktivitāti apmēram par 25% un 24% pie koncentrācijas 100 nM. No žurku nierēm un aknām attīrīta lunasīna inhibitora efekts ir līdzīgs sintētiska lunasīna inhibitora efektam pie tas pašas koncentrācijas (Hsieh et. al., 2010).

Lai noteiktu lunasīna kancerogēneses efektu, ko inducē MCA (ķīmiskais kancerogēns), tika pārbaudīta koloniju veidošanas *in vitro* NIH3T3 šūnām. Šūnām, kuras nesauņēma neko un, kuras saņēma 1 µM lunasīna bija novērojamas dažas kolonijas, bet šūnās, kuras saņēma MCA bija novērojama koloniju veidošanas vidēji 35 kolonijas/lauciņā. Šūnās, kuras saņēma 1 µM lunasīna un MCA, kolonijas bija novērojamas vairāk par 54,3%, nekā šūnās, kuras saņēma tikai MCA. Lai novērtētu lunasīna ietekmi uz šūnu ciklu, tika pārbaudīts kādu ietekmi tas rada uz p21 (ciklīna atkarīgas kināzes inhibitors 1), p15INK4b (ciklīna atkarīgas kināzes 4 inhibitors B), ciklīnu D1, CDK4 (ciklīna atkarīga kināze 4) un fosforu-Rb (ser780) ekspresijas līmeni, kad klāt ir un nav MCA vai lunasīns, kas attīrīts no miežiem. Rezultāti parādīja to, ka lunasīnam bija ietekmē uz p21 proteīnu ekspresijas līmeni NIH3T3 šūnās, kas veido kolonijas, kuras ir inducējis MCA (Hsieh et. al., 2010). MCA pievienošana šūnās samazina p21 proteīnu ekspresijas līmeni par 24%, salīdzinot ar kontroles grupu. Toties pievienojot 1 µM lunasīna šūnām, kuras saņēma MCA, p21 proteīna ekspresijas līmenis

palielinājās par 24% un 48%, salīdzinot ar kontroles grupu un grupu, kur MCA ir viens pats. Turklāt MCA uz NIH3T3 šūnām nomāca p15INK4b proteīna ekspresiju par 5%, salīdzinot ar kontroles grupu. Toties šūnām, kuram pievienoja lunasīnu, kas iepriekš saņēma MCA, notika pilnīgi pretējs efekts p15INK4b proteīnu ekspresijas līmenis uzlabojas par 47%, salīdzinot ar grupu, kur MCA bija viens pats. Vēl noskaidroja to, ka ciklīna D1 ekspresijas līmenis par 85% palielināja MCA darbību, salīdzinot ar neapstrādāto šūnu kontroles grupu. Toties 1  $\mu$ M lunasīna samazināja ciklīna D1 ekspresijas līmeni par 98%. Šūnās, kas bija apstrādātas ar MCA un MCA + lunasīns vispār neietekmēja CDK4 ekspresijas līmeni. Tāpat rezultāti parādīja, ka lunasīns samazināja Rb fosforilāciju, kuru izraisīja MCA, par 45% (Hsieh et. al., 2010).

Acetilēta histona H3 daudzums bija 79,87 ng un 39,2 ng šūnās, kuras saņēma 10 nM un 1000 nM attīrīta lunasīna no kviešiem. Tādējādi 10 nM un 1000 nM attīrīta lunasīna inhibēja histonu H3 par 16,2% un 59,1%, salīdzinot ar negatīvo kontroles grupu, kura nesaņēma attīrītu lunasīnu. Toties acetilēta histona H4 daudzums bija 8,1 ng un 3,6 ng pie koncentrācijām 10 nM un 1000 nM attīrīta lunasīna. Attiecīgi tas nozīmēja, ka 10 nM un 1000 nM attīrīta lunasīna inhibēja histonu H4 par 17,8% un 64% (Jeong et. al., 2007).

Pēc 7 un 8 nedēļām lunasīna daudzums bija apmēram 3,95 ng un 17,2 ng lunasīna/ $\mu$ g proteīna, 28,4  $\mu$ g un 290,4  $\mu$ g lunasīna/g sēklas. Kaut gan lunasīns bija novērojams tikai pēc 7 un 8 nedēļām pēc ziedēšanas. Toties pēc 4 nedēļām bija novērojams, ka lunasīns nomāc histona H3 acetilāciju, bet pēc 6 nedēļām bija redzams, ka lunasīns sāk kavēt histona H4 acetilēšanos. Pēc 6 nedēļām bija novērojams, ka lunasīns sēklās nomāc histonu H3 un H4 acetilāciju par 29,2% un 34,2%, bet pēc 8 nedēļām nomāca histonu H3 un H4 acetilāciju par 49,6% un 50,8% (Jeong et. al., 2007).

Tātad, lai noskaidrotu vai lunasīns inhibē vai nomāc kancerogenitāti, tika veikts *in vitro* eksperiments uz normālam, netumorigēnām C3H10T1/2 (C3H) šūnām. DMBA (7, 12 – dimetilbenzenantracēns) un MCA tika izmantoti, lai izraisītu koloniju veidošanos (Reznikoff et. al., 1973). Sojas BBI ir iepriekš pierādījis savas spējas attiecībā uz to, ka inhibēja koloniju veidošanos *in vitro* (Kennedy, 1993), tālab BBI izmantoja kā kontroli. 125 nM lunasīna samazināja ar DMBA apstrādāto C3H šūnu efektivitāti par 80%, salīdzinot ar pozitīvo kontroles grupu. Antitransformācijas efekts lunasīnam bija ievērojami lielāks, nekā ekvimolāram BBI, kas samazināja ar DMBA apstrādāto C3H šūnu efektivitāti par 37%. 24 h ārstēšana ar 10 nM lunasīna samazināja transformācijas efektu par 69%, salīdzinot ar pozitīvo kontroli. Toties ārstēšana ar 100 nM lunasīna transformācijas efektu samazināja par 84%, bet

palielināja efektu pie 1 un 10  $\mu$ M lunasīna par 88 un 90%. Tas liek domāt, ka lunasīns ierobežota daudzuma nonāk šūnā, bet ārēja vidē lunasīna daudzums ir palielināts, kam līdz ar to ir būtiska ietekme uz internalizāciju. Lunasīnam, kam nebija RGD (lunasīns–GRG) motīvs neuzrādīja antitransformācijas efektu, kas liecina par to, ka RGD motīvs ir nepieciešams internalizācijas procesā. Tāpat arī lunasīns, kas saturēja tikai spirālveida domēnu bez RGD motīva un poliaspartilgala (trLunasin–del) arī neuzrādīja nekādu antitransformācijas efektu (Galvez et. al., 2001).

*In vitro* inmūnoblota metode atklāja, ka lunasīns un lunasīns–GRG NH<sub>2</sub> galā saistās ar deacetilētu histonu H<sub>4</sub>, bet nesaistās ar tetra – acetilēto histonu H<sub>4</sub>, tas liecina pat to, ka lunasīnam nav nepieciešams RGD motīvs, lai saistītos ar histonu H<sub>4</sub>. Tomēr, ja NH<sub>2</sub> gals tiek izdzēsts, tad 22 aminoskābju gara sekvenca (trLunasīns) saistīšanās samazinās par 70% (Galvez et. al., 2001). Noskaidroja to, ka trLunasīnam (22 aminoskābju sekvenca) ir mazāka afinitāte, lai saistītos ar deacetilēto histonu H<sub>4</sub>, salīdzinot ar pilna garuma lunasīnu, kas ir 43 aminoskābju gara sekvenca. Tas vēl vairāk pierādīja to, ka lunasīnam ir nozīme deacetilācijas un antitransformācijas procesos (Galvez et. al., 2001).

Histonu deacetilēšana un acetilēšana ir saistīta ar eikariotu transkripcijas mehānismu (Grunstein, 1997; Struhl, 1998). Lai parādītu lunasīna efektu uz histonu acetilēšanu, eksperiments tika veikts *in vitro*, C3H un cilvēka krūts vēža šūnās MCF–7 saņēma histonu deacetilāzes inhibitoru, nātrija butirātu ar lunasīnu un bez lunasīna (Candido et. al., 1978). C3H šūnās, kurās nebija lunasīns novēroja to, ka H<sub>4</sub>–Ac līmenis palielinājās 98 reizes, MCF–7 šūnās palielinājās 40 reizes un C3H šūnās H<sub>3</sub>–Ac līmenis palielinājās 95 reizes, un MCF–7 šūnās 35 reizes. C3H šūnās, kur bija lunasīns kopā ar nātrija butirātu, nebija nosākams H<sub>4</sub> – Ac daudzums, bet MCF–7 šūnās palielinājās 10 reizes, toties H<sub>3</sub>–Ac C3H šūnās palielinājās 2 reizes, un MCF–7 šūnās 14 reizes. Saskaņā ar līdzsvara nosacījumiem, šie rezultāti liecina par to, ka histoni pārsvara kodolā ir deacetilēti, un, ja tiek pievienots histonu deacetilāzes inhibitors, ir iespējama pāreja no deacetilēta stāvokļa uz acetilēto, un lunasīns palīdz ilgāk noturēt šo pāreju (Galvez et. al., 2001).

Audzēja supresora proteīns Rb novērš E2F regulēta gēna apakšgrupas transkripciju, saistoties ar E2F faktoru un tās, līdz ar to veido histonu deacetilāzi (HDAC1), kas cenšas saglabāt hromatīnu šajā reģionā hipoacetilēta stāvoklī (Weinberg, 1995; Brehm et. al., 1998; Managhi – Jaulin et. al., 1998; Luo et. al., 1998). Rb inaktivācija noved pie tā, kā tas atvienojas no HDAC1, histonu acetilēšanas hipoacetilēta hromatīna, E2F transkripcijas faktors saistās ar savu promoteru, un aktivizē E2F regulēto gēnu, kas ir iesaistīts šūnās

vairošanās procesā. Un beigās tas viss galu galā noved pie kancerogēneses (DePihno, 1998; Nevins, 1992). Lai pārbaudītu šo teoriju, C3H šūnas bija transficētas ar E1A vīrusa onkogēnu, kas inducē šūnu proliferāciju, inaktivējot Rb (Nevins, 1992), ar un bez lunasīna. E1A, bez Rb domēna bija negatīva kontrole (Galvez et. al., 2001). C3H šūnās, kuras bija transficētas ar E1A–CR1 uzrādīja normālu šūnu dalīšanos 20 h pēc transfekcijas, gan ar, gan bez lunasīna. E1A gēna transfekcija parādīja, ka bez lunasīna šūnās, kam ir normāla morfoloģija ir neadherentu un apoptisko šūnu trūkums. Noskaidroja arī to, ka C3H un NIH3T3 šūnu proliferāciju un morfoloģiju lunasīns neietekmēja (Galvez et. al., 2001).

### 1.4.1. Pretaudzēju efekts

Lai noteiktu sojas Bowman – Birk inhibitora koncentrāta (BBIC) sastāvu, produkts tika pakļauts elektroforēzi denaturējošā gēlā (SDS – PAGE) un *Western* blota metodei, lai varētu identificēt lunasīnu. Rezultāti liecināja par to, ka abi peptīdi ir atrodami BBIC pie koncentrācijas 360 un 74,4 ng/mikrogramu proteīna. 44% no kopējā olbaltumvielu skaita BBIC sastāda lunasīns un BBI, un pārējo daļu aizņēma citi proteīni, kas arī klāt un līdz ar to var secināt, ka tie arī veicina BBIC īpašības (Hsieh et. al., 2010).

Tika analizēta BBIC nomācošā iedarbība uz NIH3T3 fibroblastu koloniju veidošanos, eksperimentā izmantoja 1160 nM BBI un 100 nM lunasīna. BBIC apspieda koloniju veidošanos par 80%, salīdzinot ar kontroles grupu. Lunasīns un BBI tika atsevišķi attīrīti no BBIC, un tad analizēja to darbību. 100 nM tīra lunasīna izolēta no BBIC samazināja koloniju veidošanos par 73%, kas ir identisks tam, ko novēroja pie 100 nM sintētiska lunasīna. Tīrs BBI izolēts no BBIC ar koncentrāciju 100 nM samazināja koloniju veidošanos par 60%. Tādējādi, var secināt, ka lunasīns bija efektīvāks, nekā BBI par 18% (Hsieh et. al., 2010).

Tika noskaidrots arī, ka tripsīna inhibitori BBI un Kunitz (KTI) pasargā lunasīnu no šķelšanas, pat pēc tam, kad tas tiek denaturēts pēc termiskās apstrādes. Aptuveni 93% un 97% no lunasīna paliek ne bojāts pēc hidrolīzes procesa, jo klāt ir BBI un KTI. Līdzīgi procentuāli lunasīns (98% un 84%) paliek ne bojāts, pēc tam, kad peptīds ir pakļauts inkubācijai ar pankreatīnu, kur klāt ir BBI un KTI (Hsieh et. al., 2010). Lunasīns nepakļaujas termiskai apstrādei (de Lumen, 2005), un tāpēc atrodas pārstrādātos sojas produktos, kas satur arī BBI (Hsieh et. al., 2010). Visi šie rezultāti liecina, ka lunasīnam būtu jāuzsūcas (jāabsorbējas) audos vai organismā pēc produktu ieņemšanas, pēc BBI un citu sojas proteāžu inhibitoru aizsardzības (Hsieh et. al., 2010).

Pārbaudīja uz pelēm un žurkām, vai per os veidā lietots lunasīns izdzīvo pēc sagremošanas kuņģa – zarnu traktā, un vai nonāk audos neskartā veidā, un ir bioaktīvs. Noskaidroja, ka lunasīns uzsūcas un izplatās dažādos audos, ieskaitot tos, kas ir visbiežāk vēža šūnu mērķis, kā, piemēram, plaušas, krūts dziedzeris un prostata. Ievēribas cienīgs fakts ir tas, ka lunasīns var šķērsot asins – smadzeņu barjeru, sasniedzot smadzenes. Pēc 3 h ilgas maksliģās barošanas novēroja, ka aptuveni 30% no kopējās iekšķīgi lietotas lunasīna devas uzsūcas organismā. Novēroja arī, ka lunasīns ir sastopams asinīs žurkām, kas ir barotas ar LES (soja bagātināta ar lunasīnu), pie monomēru koncentrācijas 17,5 ng/ml. Tomēr lunasīns, kas bija izolēts no žurkas aknām, eksistēja dimēra koncentrācijā 3,1 g/g aknās. Lunasīns (1 mikromols), kas iegūts no žurku aknām, kas barotas ar LES, nomāc koloniju veidošanos tikpat efektīvi, ka ekvimolārs sintētiskais lunasīns. Turpretī kontroles grupas žurkās, kas nebija barotas ar LES koloniju veidošanās nekavēja (Hsieh et. al., 2010).

Lunasīna un BBI *in vivo* iedarbību pārbaudīja uz krūts vēža šūnām MDA–MB–231, kas tika implantētas šūnas subkutāni Nude līnijas pelēm pēc 2 mēnešu ilgas intraperitonālas (i.p.) lunasīna ievadīšanas. Netika novērotas nekādas būtiskas ķermeņa svara izmaiņas starp četrām grupām, kas liecinātu par to, ka lunasīnam būtu kāda ietekmē uz vispārējo veselības stāvokli. Pelēm lunasīns aizkavēja audzēju rašanos. Pārbaudot audzēju sekcijas grupas, kur tika dots lunasīns uzrādīja to, ka audzēja šūnas tiek aizstātas ar apoptiskām un nekrotiskām šūnām, kas nebija novērojams kontroles un BBI grupās (Hsieh et. al., 2010). Lai noskaidrotu vairāk par antiproliferatīvo iedarbību, audzēju sekcijas analizēja imūnohistoķīmiski ar ploriferācijas marķieri Ki–67 (Scholzen & Gerdes, 2000). Lunasīns pie devām 20 mg/kg un 4 mg/kg samazināja Ki–67 ekspresiju par 34% un 30%, salīdzinot ar kontroles grupu. TUNEL pozitīvas apoptiskās šūnas tika atrastas audzējos dzīvniekiem, pie abām lunasīna devām, atklājot būtisku apoptozi šajās grupās, salīdzinot ar kontroles grupu. Dažas TUNEL pozitīvas šūnās tika atrastas audzējos, arī dzīvniekiem no BBI grupas. Tas liecina, ka pelēm, kas saņēma lunasīnu, ievērojami, samazinājās audzēju izplatīšanās ātrums un palielinājās apoptozes indekss, salīdzinot ar kontroles un BBI grupu (Hsieh et. al., 2010).

Histonu acetilēšanai caur HATs (histonu acetiltransferāze), ir nozīmīga loma transkripcijas regulēšanā caur pārveidoto hromatīna struktūru (Luo&,-Dean, 1999). yGCN5 izmanto acetil–CoA uz acetilēta lizīna–14 no histona H3 proteīna, un izveido produktus, kā, piemēram, acetilētu histonu un CoA (koenzīms A) (Hunter&,-Ferreira, 1995). Eksogēni pievienotais sintētiskais un attīrītais lunasīns no sojas zīdītāju šūnām nomāc histonu acetilēšanos nātrija butirāta klātbūtne, kas ir histonu deacetilācijas inhibitors (Jeong et. al., 2007).

Lunasīns, kas bija attīrīts MicroCon centrālās filtrs no sojas kallusa, tika izmantots  $\gamma$ GCN5 darbības noteikšanai. Kallusa lunasīns nomāca NADH (nikotīnamīda adenīdinukleotīds) ražošanu, kas neatšķiras no sintētiska lunasīna izraisīta efekta (Park et. al., 2007). Kontroles grupa, kur saņēma  $\gamma$ GCN5 un PCAF (p300/CBP – saistītais faktors), acetilētie histoni H3 un H4 koncentrācija bija 95 ng un 9,2 ng, bet grupā, kur tika saņemts 1  $\mu$ M lunasīna koncentrācija bija 39,1 ng un 4 ng. Citiem vārdiem sakot, 1  $\mu$ M tīra lunasīna inhibēja histonu H3 un H4 acetilāciju par 58,8% un 56,5%, salīdzinot ar kontroles grupu. Tīra lunasīna inhibitora efekts bija līdzīgs sintētiska lunasīna efektam (Park et. al., 2007).

Lunasīns nomāca koloniju veidošanos zīdītāju šūnās, kurus inducēja ķīmiskie kancerogēni un protoonkogēni (Galvez et. al., 2001; Jeong et. al., 2003). Attīrīts lunasīns no kallusa tika pārbaudīts vēža profilakse, izmantojot koloniju veidošanas testu NIH3T3 šūnās. Tika ņemti 1  $\mu$ M sintētiska lunasīna un 1  $\mu$ M attīrīta lunasīna. Kallusa lunasīns pilnībā nomāca koloniju veidošanas, salīdzinājuma ar pozitīvo kontroles grupu (bez lunasīna) un negatīvo kontroli (bez MCA) (Park et. al., 2007).

Pētījumā ietvaros tika pierādīts, ka lunasīns, kas izolēts no sojas, miežiem, kviešiem un rudziem spēj lokalizēties zīdītāju šūnu kodolos. Lunasīns attīrīts no kallusa spēj internalizēties peļu fibroblastu šūnās NIH3T3 un lokalizēties kodolā 18 stundas pēc lunasīna ievadīšanas. Šie rezultāti norāda uz to, ka lunasīnam piemīt pretvēža aktivitāte, un to, ka tas mijiedarbojas ar deacetilēto histonu kodolā (Park et. al., 2007).

Iepriekš tika noskaidrots, ka sojas izoflavona genisteīna (GEN) pretaudzēju īpašības darbojas caur PTEN (fosfatāzes un tensīna homologs) aktivizācijas ceļu (Dave et. al., 2005; Rahal & Simmen, 2010). Lai novērtētu sojas peptīda lunasīna (LUN) inhibitora iedarbību uz krūšu audzēja šūnām, tika inhibēta PTEN ekspresija līdzīgi GEN, MCF-7 šūnām, kuras saņēma lunasīnu. Tāda veidā tika novērtēta PTEN transkripta un promotera aktivitāte, PTEN proteīna līmenis un PTEN lokalizācija kodolā, salīdzinot ar šūnām, kam tika dots PBS un dažos gadījumos GEN. Šajā pētījumā izmantoja sintētisko lunasīnu, kurā koncentrācijas bija 50 nM un 2  $\mu$ M, augstāka, nekā cilvēka serumā un grauzēja uztura (Jeong et. al., 2007; Dia et. al., 2009). Sintētiskais lunasīns un lunasīns attīrīts no sojas pupām iepriekš parādīja to, ka spēj līdzīgas bioaktivitātes L1210 leukēmijas šūnās (De Mejia et. al., 2010). Lunasīns ar koncentrāciju 2  $\mu$ M palielināja PTEN transkripta līmeni un promotera aktivitāti (Pabona et. al., 2013). PTEN gēna ekspresijas indukcija ar 2  $\mu$ M LUN palielināja PTEN proteīna līmeni un arī palielināja PTEN lokalizāciju kodolā. Salīdzinot augstāko devu (2  $\mu$ M) ar mazāko lunasīna devu (50 nM), mazā deva nebija tikai efektīva pie PTEN transkripta līmeņa

palielināšanas, bet tā bija nedaudz efektīva pie tā, ka palielināja PTEN lokalizāciju kodolā (Pabona et. al., 2013). Densitometriskā analīze PTEN kodola iekrāsotājam šūnām parādīja to, ka GEN paaugstināja PTEN proteīna līmeni divkārt (20 nM) un pieckārt (2 μM), salīdzinot ar kontroles grupu. Tomēr lunasīns inducēja PTEN proteīna līmeni, salīdzinot ar kontroles grupu 1,5 un 3 reizes vairāk (Pabona et. al., 2013).

Jau iepriekš noskaidroja, ka GEN indukcijas izraisītā apoptoze MCF-7 šūnās mediēja PTEN (Dave et. al., 2005). Līdz ar to novērtēja, vai lunasīns var izraisīt apoptozi, un, ja tā, vai šī darbība tiek panākta ar PTEN palīdzību, vai ar LUN apstrādāto MCF-7 šūnu palīdzību. Tika pārbaudīts apoptiskais stāvoklis TUNEL eksperimentā ar un bez PTEN. Noskaidroja, ka lunasīns palielināja kodolā PTEN ekspresiju šūnās un apoptisko (TUNEL pozitīvas) šūnu skaitu. Apoptozes indukcija bija atkarīga no LUN devas. Noskaidroja vēl to, ka siRNAs (mazais interesējošais RNS) šūnās neietekmēja apoptozi, šūnām, kas saņēma LUN (Pabona et. al., 2013).

Jau iepriekš pētījumā noskaidrojām, ka PTEN papstiprina apoptozes indukciju cilvēka krūts epitēlijas šūnu līnija MCF-10A caur GEN, kas iesaistīts audzēja kontribūcija supresorā p53 (Rahal & Simmen, 2010). Konkrētāk, tas nozīmē, ka GEN PTEN indukcija bija saistīta ar p53 (53 kDa kodola fosfoproteīns) supresora pastiprināto lokalizāciju kodolā, un ar to, ka samazināja pro – proliferatīvo gēnu marķierus (Pabona et. al., 2013). Līdz ar to, mēģināja noskaidrot, vai LUN spēj darboties caur līdzīgu mehānismu. Noskaidroja, ka lunasīnam nebija nekādas nozīmīgas ietekmēs uz p53 un pro – proliferācijas marķieri C-MYC, un ciklīna D1 (CCND1) gēnu (Pabona et. al., 2013).

Peļu HC11 piena dziedzeru epitēlija šūnās saņēma kontroles vielu vai lunasīnu (1 μM) 6 h, tika vērtēti E-kadherīna un b-katenīna līmeņi. Šūnās, kuras saņēma lunasīnu bija skaitliski vairāk novērojams E-kadherīna un b-katenīna līmenis, salīdzinot ar kontroles vielas apstrādāto šūnu grupu. B-katenīna proteīnu pieaugums bija raksturīgs tikai šai šūnu frakcijai, jo b-katenīna līmenis neatšķiras ar LUN un kontroles grupu. Lunasīnam nebija nekāda ietekme uz C-MYC HC11 šūnās, tāpat nebija nekādas ietekmes uz C-MYC ekspresiju MCF-7 šūnās un nomāca arī gēna Wnt-1 šūnu izraisīto C-MYC ekspresiju (Pabona et. al., 2013). Noskaidroja arī to, ka LUN neietekmēja mamosfēras vienības P1 un P2 (Pabona et. al., 2013).

Pētījumā noskaidroja, ka pelēm, kuras saņēma 250 μg lunasīna nedēļā samazinājās audzēju sastopamība par 70%, tāpat samazināja audzēju rašanas iespēju, salīdzinot ar kontroles grupu. Bet lunasīna devas 2,5 un 25 μg/nedēļā samazināja audzēju biežumu un rašanas iespēju. Eksperimenta beigās tika ievākti audzēju paraugi pēc 19 nedēļām. Audzēju

histopatoloģija uzrādīja, ka šūnās vairs bija sastopamas tikai papilomas un karcinomas (Galvez et. al., 2001).

### 1.4.2. Pretiekaisuma efekts

Iekaisums ir kritisks faktors, kas veicina audzēju progresēšanu (Dia et. al., 2009). Šūnas, kas cieš, no iekaisuma izraisa dažādas proinflammatora reakcijas, kas var bojāt DNS, ka rezultātā tiek veicināts audzējs. NO (slāpekļa oksīds) spēlē svarīgu lomu iekaisuma patoģenēzē, un tas tiek uzskatīts par pro – iekaisuma mediatoru, kas izraisa iekaisumu (Sharma et. al., 2007).

Pētījuma tika pārbaudīts, vai lunasīns spēj ietekmēt makrofāgu šūnu līniju RAW 264.-7 dzīvotspēju un atklājās, ka lunasīns neietekmēja makrofāgu šūnu līniju RAW 264.-7 dzīvotspēju. Atklāja arī to, ka lunasīns var inhibēt pro – iekaisuma reakcijas ar koncentrāciju 10 mikromoli. Tā kā NO kontrolē inducējama slāpekļa oksīda (iNOS) sintēzi, tad tika pārbaudīts iNOS uz makrofāgu šūnu līniju RAW 264.-7, kurās bija ievadīts lunasīns. Izmantoja *Western* blota metodi. iNOS ekspresija ievērojami samazinājās pie 200 mikromoliem lunasīna. Šie rezultāti parādīja to, ka lunasīns ir spējīgs arī pie zemākām koncentrācijām (10 mikromoli) inhibēt fermentus, un var samazināt iNOS ekspresiju pie augstākām koncentrācijām. Lai vēl vairāk saprastu lunasīna lomu iekaisuma, tika pārbaudīts, vai lunasīns spēj ietekmēt PGE2 ražošanu un COX–2 ekspresiju LPS stimulētas makrofāgu šūnu līnijas RAW 264.-7 (Dia et. al., 2009).

Noskaidroja, ka lunasīns ievērojami samazināja PGE2 ražošanu un COX–2 ekspresiju, pie 100 mikromoliem lunasīna. Augstākās koncentrācijas lunasīns (200 un 300 mikromoli) būtiski samazināja PGE2, kas ļāva secināt, ka, iespējams, lunasīns ir spēcīgs COX–2 inhibitors (Dia et. al., 2009).

Šie rezultāti ļauj secināt, ka lunasīnam var būt svarīga lomā tajā, lai novērstu iekaisumu, nomācot COX–2/PGE2 un iNOS/NO ceļus. Tam, protams, var arī būt nopietna ietekmē uz veselību, tāpēc ir nepieciešami vēl papildus *in vivo* pētījumi (Dia et. al., 2009).

Kā jau iepriekš tika noskaidrots lunasīns spēlē svarīgu lomu iekaisuma procesos, līdz ar to zinātnieki vai pētnieki vēlējas noskaidrot vai lunasīnam līdzīgi peptīdi arī spēj ietekmēt iekaisuma procesus.

Makrofāgu šūnu līnija RAW 264.-7 tika stimulēta ar LPS (liposaharīdi). Noskaidroja, ka ievadot LPS, iNOS pastiprinās, un līdz ar to arī NO ražošanas palielinās. 5 kDa peptīds atbild par to, ka lunasīns inhibē NO ražošanu par 43% pie 10 mikromolu devas, bet divi citi peptīdi, 8 kDa un 14 kDa, uzrādīja būtisku NO produkcijas kavēšanu, sākot ar 25 mikromolu devu. NO ekspresija ievērojami samazinājās, kad šūnas tika ārstētas ar 25 mikromoliem 5 un 8 kDa peptīdiem, un ar 50 mikromoliem 14 kDa peptīda. Tāpat arī jāatzīmē, ka 5 kDa peptīds samazināja NO daudzumu, ko ražo pie mazākās koncentrācijas, nekā nepieciešams, lai samazinātu iNOS, tādējādi norādot, ka šis peptīds ne tikai darbojas proteīna ekspresijas līmeni, bet arī nomāc iNOS aktivitāti. 5 kDa peptīds spēcīgi inhibē iNOS ekspresiju un NO produkciju salīdzinot ar 8 kDa un 14 kDa peptīdiem (de Meija&,-Dia, 2009).

Lunasīns un lunasīnam līdzīgie peptīdi ietekmēja COX-2 ekspresiju un PGE2 ražošanu. 5 kDa peptīds nomāca PGE2 un COX-2 pie 10 mikromoliem devas par 13% un 14%. 8 kDa peptīds ievērojami samazināja PGE2 ražošanu un COX-2 ekspresiju pie 25 un 50 mikromoliem, savukārt 14 kDa peptīds ievērojami nomāca COX-2/PGE2 ceļu. Turklāt neviens no peptīdiem neietekmēja COX-1. 5 kDa peptīds visspēcīgāk nomāca pie IC50 (puse no maksimāli inhibējošas koncentrācijas) 25 un 41 mikromolu devas COX-2 un PGE2 (de Meija&,-Dia, 2009).

Pie koncentrācijas 10 mikromoli, 5 kDa, lunasīnam līdzīgs peptīds, inhibē IL-6 produkciju par  $775,6 \pm 0,9\%$ , bet pārējie divi peptīdi neinhibēja IL-6 ar minēto koncentrāciju. Palielinot 5 kDa koncentrāciju līdz 25 un 50 mikromoliem rezultātā novēroja, ka IL-6 ražošana ir pilnībā bloķēta LPS inducētajā makrofāgu šūnu līnija RAW 264. - 7. No otras puses, 8 kDa peptīds inhibē IL-6 produkciju par  $55,6 \pm 6,7\%$  pie 50 mikromolu koncentrācijas, bet 14 kDa peptīds izraisīja IL-6 produkcijas inhibīciju pie šīs pašas koncentrācijas (50 mikromoli). Bez tam lunasīns un lunasīnam līdzīgie peptīdi nomāca LPS inducēto IL-1 $\beta$  ražošanu, makrofāgu šūnu līnija RAW 264.-7. 5 kDa un 14 kDa lunasīnam līdzīgie peptīdi nomāca IL-1 $\beta$  ražošanu pie koncentrācijas 10 mikromoli par  $33,3 \pm 11,8\%$  un  $30,4 \pm 0,9\%$ . 8 kDa, lunasīnam līdzīgs peptīds, nomāca IL-1 $\beta$  ražošanu ievērojami pie 50 mikromolu koncentrācijas. IL-1 $\beta$  spēcīgi nomāca 5 kDa peptīdu ar IC50 13 mikromoli, bet bija nepieciešama augstāka koncentrācija 8 kDa (62 mikromoli) un 14 kDa (34 mikromoli) peptīdiem, lai rezultātā par 50% samazinātu IL-1 $\beta$  (de Meija&,-Dia, 2009).

Pētījuma ietvaros noskaidroja arī, ka 5 kDa, lunasīnam līdzīgs peptīds, visvairāk nomāca NF- $\kappa$ B aktivāciju pie koncentrācijām 25 līdz 50 mikromoli. Ārstēšana ar 25 un 50 mikromoli 5 kDa rezultātā par 65,2% un 90,2% inhibēja NF- $\kappa$ B (aktivēto B šūnu kodola

faktors kappa) aktivāciju. Divi lunasīnam līdzīgie peptīdi, 8 un 14 kDa, ievērojami nomāca NF-κB aktivāciju pie 25 un 50 mikromolu koncentrācijas. Turklāt, 5 kDa peptīds visvairāk inhibē NF-κB aktivizēšanu, salīdzinot ar pārējiem diviem peptīdiem (de Mejia&,-Dia, 2009).

Ir pierādīts, ka lunasīns kombinācijā ar IL-12 vai IL-2 spēcīgi iedarbojas uz IFN $\gamma$  (interferons gamma), granzīmu B un NK (*natural killer cells*) šūnām izraisot sinerģisku efektu; un šis sinerģiskais efekts rada spēcīgu NK šūnu aktivizēšanos, kuras rezultāta tiek pastiprināta citotoksicitāte. Proti, lunasīna un citokīnu kombinācija spēj atbrīvot IFN $\gamma$ , NK šūnās no pacientiem, kam ir limfoma (Cheng et. al., 2014).

Lai noskaidrotu vai lunasīns var izraisīt IFN $\gamma$  ražošanu šūnās, PBMCs (periferiālo asiņu mononukleāras šūnās) veseliem donoriem, bija šūnas bez un ar lunasīnu, tāpat lunasīnam tika pievienots vai IL-12, vai IL-2 (Cheng et. al., 2014). Tā kā zināms, ka IL-12 un IL-2 var izraisīt IFN $\gamma$  ražošanu caur NK šūnām (Smith et. al., 2004), tad šos divos citokīnus izmantoja salīdzināšanai (Cheng et. al., 2014). Pēc 1 dienas stimulācijas, atsevišķas šūnu populācijas, kas atsaucās uz stimulāciju tika vērtētas, izmantojot šūnu iekrāsošanu uz IFN $\gamma$ . Noskaidroja, ka CD4+ un CD8+ T populācijas šūnās joprojām bija negatīvas uz visiem stimuliem, bet NK šūnu CD3 -, CD56 + populācija bija pieaudzis IFN $\gamma$  pozitīvo šūnu skaits pēc stimulācijas ar lunasīnu un IL-12, un IL-2, salīdzinot ar pašiem citokīniem (Cheng et. al, 2014). CD56 pozitīvas apakškopas NK šūnās ir galvenās šūnas, kas ražo IFN $\gamma$  ar regulējošām funkcijām, savukārt CD56 vāji pozitīvo šūnu populācija ir atbildīga par citolītisko aktivitāti (Cooper et. al., 2001; Caligiuri, 2008). Tika analizēts arī tas vai CD56 pozitīvo un vāji pozitīvo šūnu populācijas ražo intracelulāro IFN $\gamma$ , rezultāti liecināja par to, ka, ja pievieno klāt lunasīnu ar IL-12 vai IL-2, kur klāt vēl ir kultivētas NK šūnas, noskaidroja, ka CD56 pozitīvo un vāji pozitīvo šūnu populācijas stimulē IFN $\gamma$  ražošanu. Tālāk pārbaudīja lunasīna ietekmi uz NK šūnām. Rezultāti parādīja, ka lunasīns kopā ar IL-12 vai IL-2 ievērojami palielina IFN $\gamma$  līmeni šūnās (Cheng et. al., 2014). Tādējādi varētu šķīst, ka lunasīns izraisa sinerģisku efektu tikai pateicoties citokīniem IL-12 un IL-2, kas ekspresējas uz mērķa gēniem NK šūnās (Cheng et. al., 2014).

Lai definētu lunasīna kombinācijas atbildi, noskaidroja EC50 (puse no maksimālās efektīvās koncentrācijas), pamatojoties uz IFN $\gamma$  ražošanu IL-12 kultivētās cilvēka NK šūnās. Pie IL-12 kocentrācijas 10 ng/ml, lunasīna EC50 bija  $5,64 \pm 2,23$  mikromoli. Lai noteiktu, vai lunasīns pastiprina sinerģijas efektu kopā ar citokīnu kokteili ar IL-12 un IL-2, cilvēka NK šūnās tika kultivēti citokīni gan ar, gan bez lunasīna. Atklāja, ka lunasīns kopā ar citokīnu kokteili arī izraisa sinerģisku efektu, kas ražo IFN $\gamma$  (Cheng et. al., 2014).

Kā iepriekš ir noskaidrots, STAT4 (signāla transkripcijas un aktivācijas faktors 4) trūkums ir novērots limfomas pacientiem pēc PBSCT (periferiālo cilmes šūnu transplantācija) (Lupov et. al., 2011). PBMCs pacientu stimulācija ar IL-12 un IL-2 izraisīja IFN $\gamma$  ražošanu caur NK šūnu populāciju izmantojot šūnu iekrāsošanu, lai gan ir daudz mazāk, nekā salīdzinot ar citām šūnām no kontroles grupas. Pievienojot klāt lūnasīnu, tas vēl vairāk palielināja pacientos NK šūnu procentuālo daļu, kas ražo IFN $\gamma$ , tas bija līdzīgi arī kontroles vielas grupa un citokīnu kontroles grupa. Tādējādi, iekļaujot lūnasīnu citokīnu bāzes terapijā var nodrošināties pret to, lai IFN $\gamma$  tiek ražots caur NK šūnām normāli, pat pacientiem, kam ir smaga limfoma ar iegūto STAT4 deficītu (Cheng et. al., 2014).

NK šūnām, kas ir kultivētas, piemīt vāja citolītiska aktivitāte pret Raji limfomas šūnām, kas ir izturīgas pret NK - veikto šūnu nogalināšanu. Citokīni izraisīja NK šūnu aktivizēšanu, kas uzlaboja citotoksicitāti pret Raji šūnām. Turklāt lūnasīns vēl pastiprina dabisko NK šūnu citotoksicitāti, kas ir negatīvi atlasīti (97% tīrība) un stimulēta ar suboptimālo citokīnu koncentrāciju pret Raji šūnām. Tālāk analizēja kādu ietekmi atstāj suboptimālais IL-2 ar vai bez lūnasīna uz granzīmu B, izmantojot šūnu krāsošanu. Rezultāta atklājas, ka lūnasīns palielināja olbaltumvielu līmeni granzīmā B. Tika arī konstatēts, ka CD56 populācijā bija sastopama krietni vien daudz granzīma B, kad lūnasīns tika pievienots klāt šūnu kultūrai, salīdzinot ar IL-2 kontroles grupu (Cheng et. al., 2014).

Tika izpētīta arī lūnasīna ietekmē uz FasL (Fas ligands) izraisīto apoptozi kopā ar IL-2. Plūsmas citometrijas analīze uzrādīja minimālu lūnasīna ietekmi uz FasL NK šūnu kultūru suboptimālo IL-2. Turklāt, kultivētās NK šūnās, kas bija apstrādātas ar FasL – bloķējošo antivielu vai kontroles izotopu bija novērojama līdzīga nogalināšanas aktivitāte pret Fas – *expressing* Raji mērķa šūnām, kas liecināja par to, ka lūnasīns neietekmēja FasL mediatoru nogalināšanas efektu uz NK šūnām ar aktivizētu suboptimālo IL-2 (Cheng et. al. 2014).

Šūnu terapijā, izmantojot NK šūnas, kas bija aktivizētas *in vitro*, šūnas tika klīniski testētas pret vairākiem audzējiem (Miller et. al., 2005; Srivastava et. al., 2008; Ljunggren & Malmberg, 2007). Jo Raji limfomu ksenotransplantāta modelī, audzēju šūnu augšana palielinājās laikā gaitā kontroles pelei, kurai nebija ievietotas cilvēka NK šūnas. Audzējs pelēm samazinājās pēc 27 dienām pēc tam, kad tas bija saņēmušas citokīnu aktivizētas NK šūnas un NK šūnas, kas bija aktivizētas ar lūnasīnu un citokīniem, salīdzinot ar kontroles grupu (Cheng et. al., 2014).

Lai novērtētu, vai lūnasīns var uzlabot IFN $\gamma$  ražošanu *in vivo* BALB/c pelēm tika dota viena intraperitoneāla injekcija (i.p.), kur klāt bija IL-2. Pēc astoņpadsmit stundām pēc

injekcijas ievadīšanas noteica IFN $\gamma$  līmeni serumā pelēm, kas saņēma PBS (fosfāta sāļu šķīdums), IL-2, vai lunasīnu. IL-2 un lunasīna kombinācija izraisīja IFN $\gamma$  sekrēciju serumā, kur lunasīns tika dots 0,4 mg/kg uz ķermeņa masas (Cheng et. al., 2014).

Tika pētīts lunasīna efekts uz NK šūnām *in vivo*. Lunasīna un IL-2 kombinācija ievērojami paaugstināja CD69+ vai granzīmu B + NK šūnas, salīdzinot ar PBS kontroles grupu. Šūnu iekrāsošanas analīze noteica, ka NK šūnas ir atbildīgas par IFN $\gamma$  ražošanu pelēs, kur ir gan lunasīns, gan IL-2. IL-2 nepietiekamo devu ietekmē nebija nosakāma uz īstermiņa ārstēšanu, toties, lunasīns ar IL-2 kopā varēja izraisīt NK šūnu aktivizāciju (Cheng et. al., 2014).

Lunasīna peptīds satur RGD motīvu, kas saistās ar integrīnu, kas ir sastopams dažāda tipa šūnās, ieskaitot NK šūnās (Ruoslahti&,-Pierschbacher, 1986). Lai izpētītu RGD motīva funkcijas lunasīnā, tas tika ķīmiski sintezēts (Cheng et. al., 2014). Ķīmiski sintezētais peptīds izraisīja līdzīgu IFN $\gamma$  līmeni NK šūnās, salīdzinot ar pilna garuma lunasīnu, tas liecina par to, ka pēdējās 11 aminoskābes nav vajadzīgas, lai lunasīns varētu modulēt imūnās funkcijas NK šūnās, lai gan tās ir svarīgas, lai mudinātu apoptozi, lai varētu transformēt vēža šūnās (Galvez&,-de Lumen, 1999). Pierādīja, ka lunasīns spēj kavēt histona H3 acetilāciju ar p300/CBP – saistīto faktoru (PCAF) palīdzību, kas ir histonu acetilāzes ferments (Galvez et. al., 2001). Tika pārbaudīta arī lunasīna ietekme uz NK šūnu epiģenētisko mehānismu. Saskaņā ar gēnu ekspresijas profilu TGF $\beta$ 1 (augšanas faktors beta 1), mazākā daļa acetilēta histona H3 līmenis (AcH3) bija negatīvi saistīts ar TGF $\beta$ 1 *locus* NK šūnās, kas bija apstrādātas ar lunasīnu un IL-12, salīdzinājumā ar IL-12 vienu pašu. Un otrādi lielākā daļa AcH3 līmenis bija pozitīvi saistīts ar IFN $\gamma$  *locus* NK šūnās, kas bija apstrādātas ar lunasīnu plus IL-12, nekā tajā šūnās, kur citokīni bija vieni paši. Tas liecina par to, ka lunasīns spēj modulēt AcH3 līmeni saistošajos mērķa gēnos, kā arī spēj regulēt gēnus (Cheng et. al., 2014). Pētījumā arī tika noskaidrots, ka pievienojot klāt lunasīnam IL-12, tas nekādi neietekmēja metilēta histona H3 pie lizīna 9 (H3K9me3) līmeni. Rezultātā arī noskaidroja, ka lunasīns, kas ir klāt pievienots citokīnu – kultivētām NK šūnām spēj pastiprināt STAT4 aktivizēšanu, kas līdz ar to arī veicina IFN $\gamma$  indukciju NK šūnās (Cheng et. al., 2014).

Pētījumā noskaidroja, ka lunasīna internalizācija pieauga un lunasīns tika uzsūkts visas šūnās pēc tam, kad saņēma LPS (pro – inflamatora aģents) un vitronektīnu. Salīdzinot ar PBS grupu un stimulēto grupu, lunasīna uzņemšana pieauga par 2,5 un 2,9 reizēm, bet grupa, kur LPS un vitronektīns bija kopā pieauga par 3,3 reizēm. Šūnās, kuras saņēma lunasīnu

samazināja  $\alpha\beta 3$  integrīna bazālo ekspresiju uz plazmas membrānas virsmas par 1,2, 1,3, 1,4 un 2,0 reizēm, salīdzinot ar kontroles grupu (Cam et. al, 2013).

Imūnoflourescences analīze noskaidroja, ka lunasīna uzņemšana ar katru laikā periodu palielinājās, lai gan vērtības statistiski atšķiras tikai par 1 h. Noskaidroja to, ka lunasīns neietekmēja klatrīna ekspresiju uz šūnu membrānas virsmas. Pats lunasīns internalizējās intracelulārajos pūslīšos (Cam et. al., 2013).

Imūnocitoķīmiskā analīze parādīja, ka LPS (10 nM) un vitronektīns (130 nM) veicināja lunasīna internalizāciju šūnā, salīdzinot ar PBS kontroles grupu. Pie visām grupām, kas saņēma lunasīnu varēja novērot, ka klatrīna ekspresija membrāna palika neietekmēta. Eksperimentā beigas rezultāti liecināja par to, ka lunasīna uzņemšana neietekmēja klatrīna ekspresiju uz plazmas membrānas virsmas (Cam et. al, 2013).

Tāpat noskaidroja, ka lunasīns regulē kaveolīna-1 ekspresiju uz membrānas par 1,4, 2,0 un 3,0 reizēm pēc tam, kad lunasīns bija ievadīts pēc 5 un 15 minūtēm, un pēc 1 h. Eksperimentā beigas noskaidroja, ka kaveolīns-1 nostiprinās uz šūnu membrānas pēc tam, kad lunasīns ir ievadīts robežas no 15 minūtēm līdz 1 h. Pēc tam, kad lunasīns bija apstrādāts ar brefeldīnu A (BFA) novēroja, ka tas nomāca lunasīna internalizāciju šūnā par 97,5, 99,6 un 99,8%. Pēc 30 minūšu lunasīna apstrādes ar BFA, lunasīns samazināja  $\alpha\beta 3$  integrīna ekspresiju, bet visos citos laikos nenovēroja nekādas izmaiņas. Līdz ar to var secināt, ka BFA ietekmēja lunasīna endocitozes procesus (Cam et. al., 2013).

Pētījumā ietvaros noskaidroja, ka nistatīns (kaveolīna mediētais endocitozes inhibitors) samazināja lunasīna uzņemšanu par 60,9%, salīdzinot ar kontroles grupu. Savukārt, amantadīns (klatrīna mediētais endocitozes inhibitors) un amilorīds (makropinocitozes inhibitors) samazināja lunasīna endocitozi par 97,7 un 99,5%. Tas ļāva beigas secināt, ka lunasīna endocitozes procesi lielā mērā, ir saistīti, ar klatrīna struktūras pārklājumu un makropinosomām. Pētījumā arī tika noskaidrots, ka lunasīns neietekmēja intracelulārā  $Ca^{2+}$  līmeni makrofāgos, kas bija apstrādāti ar ekhistatīnu (Cam et. al., 2013).

Iepriekšējos pētījumos ir noskaidrots, ka nekancerogēnu zīdītāju šūnu pirmapstrāde ar lunasīnu, ka, piemēram, NIH3T3 un C3H10T1/2 šūnām, pēc 24 h lunasīna ievadīšanās, nomāc koloniju veidošanos, ko ir inducējuši ķīmiskie onkogēni vai E1A onkogēns (Galvez et. al., 2001; Lam et. al., 2003). Šie rezultāti saskan ar izteikto apgalvojumu, ka adenovīruss E1A izraisa transformāciju un 24 h pēc vīrusa ievadīšanas var novērot gēnu ekspresijas izmaiņas (Ferrari et. al, 2008). Līdz ar to tika izpētīta lunasīna ietekmē uz gēnu ekspresiju uz divām

prostatas epitēlija šūnu līnijām, RWPE-1, nekancerogēna prostatas epitēlija šūnu līnija, un, RWPE-2, RWPE-1 tumorogēnais variants, pirms un pēc lunasīna ievadīšanas (Huanq et. al., 2011). Izvēlējas prostatas vēža epitēlija šūnu līnijas tāpēc, ka šīs vēzis ir bieži sastopams un ir lēni augošs vēzis, kas ir labs kandidāts, lai pārbaudītu bioaktīvo pārtikas sastāvdaļu, ka, piemēram, lunasīna ietekmi uz vēzi. No 14,500 gēniem, 114 gēnos pēc lunasīna apstrādes (2  $\mu$ M) lunasīna varēja vairāk, - nekā divas reizes novērot ekspresijas izmaiņas. No 114 gēniem, 112 gēnus regulēja RWPE-1 šūnās, bet pārējos divus gēnus (COL5A1 un LAMP1) regulēja RWPE-2 šūnās. Gēnus, kurus regulē RWPE-1 ir iesaistīti šūnu cikla, atbild par šūnu proliferāciju un DNS procesiem, tāpat ir svarīga loma audzēju supresijas procesos un pro – apoptiskos ceļos. Noskaidroja, ka pro – apoptiskos gēnus THBS1 (trombospondīns 1) un HIF1 $\alpha$  (hipoksijas inducējošais faktors alfa 1), un antiproliferatīvos gēnus PRKAR1 $\alpha$  (cAMP atkarīga proteīnkināzes tips 1 alfa) un TOB1 (proteīnu kodējošais gēns) regulē lunasīns RWPE-1 šūnās (Huanq et. al., 2011). Tad ar *Western* blota metodes palīdzību noskaidroja, ka proteīnu ekspresijas līmenis bija augstāks RWPE-1 šūnu gēnos HIF1 $\alpha$ , PRKAR1 $\alpha$  un TOB1, nekā RWPE-2 šūnu gēnos ar vai bez lunasīna. RWPE-1 šūnu gēns HIF1 $\alpha$  uzrādīja 3 reizes lielāku indukciju, nekā RWPE-2 šūnu gēns THBS1. Proteīnu skaits neatšķiras RWPE-1 gēnos PRKAR1 $\alpha$  un TOB1, grupas, kur bija un, kur nebija lunasīns, salīdzinot ar RWPE-2 šūnu gēniem (Huanq et. al., 2011). HIF1 $\alpha$  un THBS1 regulācija ir saistīta ar prostatas audzēja supresiju un kuņģa karcinomu (Chen et. al., 2009; Komuro et. al., 2009).

Novēroja, ka 20  $\mu$ M lunasīna lokalizējas RWPE-1 un RWPE-2 šūnu perinukleārajā reģionā pēc 3 h un 24 h ievadīšanās, salīdzinot ar kontroles grupu. Tomēr, kad RWPE-2 šūnās saņēma 50  $\mu$ M lunasīna 24 h, varēja imūnofluorescences mikroskopā novērot, ka lunasīns ir lokalizējies gan kodolā, gan citoplazmā. Kodolā lunasīns vairāk bija lokalizējies transkripcijas aktīvajos rajonos, kur ir sastopams hromatīns (Chubb, 2009). Iepriekšējie imūnofluorescences pētījumi, kur tika izmantots NIH3T3 šūnās parādīja, ka lunasīns kopā hromatīnu lokalizējas kodolā pēc viena šūnas cikla dalīšanas procesa, bet to varēja novērot tikai tad, kad šūnas metafāzē aktīvi dalījās (Lam et. al., 2003). Kopumā šie rezultāti norāda uz to, ka RWPE-2 šūnās var izstumt lunasīnu no ārpusšūnas telpas un diferenciāli ietekmēt lunasīna ekspresiju uz gēniem (Huang et. al., 2001).

Ir zināms, ka lunasīnam piemīt hemopreventīvas īpašības, papildus šīm īpašībām lunasīns vēl spēj saistīties ar hipoacetilētu hromatīnu (Galvez&,-de Lumen, 1999; Galvez et. al., 2001). Lai noskaidrotu vai lunasīns tieši saistās ar histonu H4 tika veikti imūnoprecipitācijas (IP) eksperimenti. Rezultāti parādīja, ka lunasīns mijiedarbojas ar rH4 (rekombinantais histons H4). Mijiedarbība starp lunasīnu un rH4 bija specifiska. Interesanti

vēl bija tas, ka gan lūnasīna, gan histona H4 antivielu olbaltumvielas migrēja uz vieniem un tiem pašiem kompleksiem, 23 kDa un 50 kDa. Noskaidroja vēl, ka lūnasīns un rH4 23 kDa proteīna komplekss ir monomēra forma un 50 kDa proteīna komplekss ir dimēra forma. Kaut arī šī interpretācija bija apstiprināta vairākos eksperimentos, tomēr rezultāti norāda, ka lūnasīns ir cieši saistīts ar rH4 reakcijas procesiem (Huanq et. al, 2011).

Kā jau iepriekš noskaidroja, tad lūnasīns ievērojami kavē histona H4 tetra – acetilāciju C3H10T1/2 un MCF-7 šūnās, kuras saņēma nātrija butirātu (Galvez et. al., 2001). Nātrija butirāts palielina histonu acetilēšanos inhibējot histonu deacetilāzi (HDAC) (Huanq et. al., 2011). Līdz ar to lūnasīns var saistīties un maskēt deacetilētos histonus un tādā veidā arī tiek kavēta histonu acetilācija, līdzīgi, ka cilvēka endogēnais audzēja supresors, ANP32A (proteīnu kodējošais gēns), dara (Seo et. al., 2001; Kutney et. al., 2004). Histonu acetilēšanas inhibīcija korelē ar gēnu ekspresijas apslāpēšanu un tā regulācijas samazināšanos (Varier et. al., 2004). Pētījuma rezultāti parādīja, ka lūnasīns tomēr regulē gēnu ekspresiju nekancerogēnas prostatas epitēlija šūnās, tādējādi radot jautājumu, kā histonu inhibitors acetilē gēnu ekspresiju (Huanq et. al., 2011). Lūnasīnam ir hromosaistošais motīvs, kas saistās cieši uz deacetilēta histona H4, nekā uz lūnasīna poliaspartilgala (Galvez et. al., 2001), kas liecina par to, ka lūnasīns var nomaskēt histona H4 lizīna atlikumu, izmantojot hromosaistīšanas vietu (Huanq et. al., 2011).

Lai noskaidrotu vai lūnasīnam ir potenciāls apslēpt lizīna atlikumu uz histona H4 aminoskābēm pēc acetilācijas, tika veikta HAT (histonu acetiltransferāze) pārbaude uz K5, K8, K12 un K16 acetilāciju (Huanq et. al, 2011). Acetilācijas līmeni normalizēja ar skābes ekstrahēto histonu paraugu H4K5, K8, K12 un K16, un tetra acetilēto histonu H4. HAT pārbaude bez lūnasīna, HAT1A acetilēja vairāk K5 un K12, bet mazāk K8 un K16 (Huanq et. al., 2011). HAT1A spēlē svarīgu lomu citoplazmatiskā HAT enzīma acetilācija, kas atbild par jaunajiem histoniem, kur tiek acetilētie pie H4K5 un K12 pirms nokļūšanas kodolā un deponēšanas nukleosomas DNS replikācijas laikā (Sobel et. al., 1995). HAT nukleosomas PCAF un p300 ir iesaistītas gēnu ekspresijas regulācija (Huanq et. al., 2011). p300 ir gēnu ekspresijas koaktivators, un PCAF ir sekundārais koaktivators, kas saistās ar p300 vai CBP acetilēto hromatīnu lokāli (Schiltz et. al., 1999). Ja nav lūnasīna klāt, tad gan p300, gan PCAF acetilē H4K8 (Schiltz et. al., 1999). Toties lūnasīna klātbūtne bija novērojams, ka p300 un PCAF, un mazākā mēra arī HAT1A samazināja K8 acetilāciju un palielināja K16 acetilāciju. Histona H4 tetra acetilēšana ievērojami kavēja lūnasīna darbību PCAF HAT reakcijas, bet nekavēja p300 un HAT1A reakcijas (Huanq et. al., 2011). Lai apstiprinātu lūnasīna spēju acetilēt konkrēti H4 lizīna atlikumu, tika veikts HAT tests, izmantojot rH4. Kad lūnasīns bija

pievienots klāt HAT reakcijā, novēroja, ka H4K8 acetilēšanas ievērojami samazināja HAT reakciju, kuru katalizēja visi trīs HAT enzīmi. H4K16 acetilācijas pieaugums bija novērojams HAT reakcijas, kad reakciju katalizēja PCAF un HAT1A, bet pieaugums nebija novērojams, tad, kad to katalizēja p300. Tas liek domāt, ka kodola HAT enzīms, p300, nav spējīgs acetilēt H4K16, ja histons H4 ir hipoacetilēts, neatkarīgi no tā vai ir klāt lunasīns vai nav (Huanq et. al., 2011).

Lunasīns būtiski neietekmēja H4K8 acetilāciju, bet rezultātā bija novērojams H4K16 acetilācijas pieaugums RWEP-1 un RWEP-2 šūnās, salīdzinot ar kontroles grupu. Ja lunasīns regulē RWEP-1 šūnu gēnus, kas veicina H4K16 regulāciju, tad šīm gēna hromatīnam iekšā vai apkārt ir jābūt bagātām ar hipoacetilētu H4K16. Un otrādi, hipoacetilētam H4K16 ir jābūt RWEP-2 šūnu hromatīnā (Huanq et. al., 2011).

Bioinformātiska analīze parādīja, ka vairāk nekā vienā trešdaļa no 112 gēniem regulē RWEP-1 šūnu gēnus CPG. Lunasīns nespēj regulēt THBS-1 RWEP-2 šūnās, kas liecina par to, ka ir notikušas epigēnētiskas pārmaiņas 5' gēna galā (piemēram, H4K16 hipoacetilācija un DNS hipermetilācija CPG šūnās), kas apklusināja transkripciju un padarīja gēnu grūti pieejamu lunasīnam (Huanq et. al., 2011).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Imūnofluorescences analīze

SH-SY5Y šūnas (ATCC<sup>®</sup> CRL-2266<sup>™</sup>) *Western* blota un imūnofluorescences analīzei saņēmu no darba vadītājas Unas Riekstiņas.

#### 2.1.1. Šūnu fiksēšana uz priekšmetstikliņa

Šūnas fiksēja uz 4-lauciņu priekšmetstikliņa (Nunc) 20 min ar 4% formaldehīda (Sigma) šķīdumā PBS (0,137 M NaCl, 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), un pēc fiksēšanas skaloja 1x ar PBS.

Ar PBS pārklātu priekšmetstikliņu ar fiksētām šūnām var uzglabāt 2 – 8 ° C temperatūrā līdz 3 mēnešiem, vai arī tos var iekrāsot nekavējoties.

ar lun	ar lun	bez lun	bez lun
2 μM	2 μM		

2.1. att. Šūnu apstrādes shēma uz 4-kameru priekšmetstikliņa.

#### 2.1.2. Inkubācija ar antivielām

Imūnofluorescences metodei izmantotie reaģenti: primārā antiViela: poliklonāla trušu antiViela (CASLO, Dānija), kas iegūta imunizējot trušus ar lunasīna peptīdu, bloķēšanas buferis (5% BSA, 0,3% TritonX-100, PBS; visi reaģenti iegādāti no Sigma), skalošanas un inkubēšanas šķīdums (1X PBS, 1% liellopa albumīna (BSA), sekundārā antiViela: ar FITC konjugēta kazas antiViela pret trušu IgG-, (Jackson Immuno Research). Kodola kontrastkrāsViela DAPI (2, 4 – diamino – 2 – fenillindols; Invitrogen), ieslēgšanas vidē ProLong Gold (Invitrogen).

Priekšmetstikliņu divas reizes ar 400 μL skalošanas bufera skalo (1% BSA/PBS), un tad bloķē un permeabilizē šūnas ar 0,5 mL bloķēšanas/permeabilizācijas bufera (5% BSA/0,3% Triton X-100/PBS) un inkubē 45 minūtes istabas temperatūrā. Pēc tam nolej bloķēšanas buferi. Skalošana nav nepieciešama.

Atšķaida primāro antivielu 1:1000 atšķaidīšanas buferī un uznes 400 µL šķīduma trijos no 4 lauciņiem, ceturtajā jeb kontroles lauciņā ienes tikai atšķaidīšanas buferi (1% BSA/PBS) bez antivielas un inkubē 16 h 2 – 8 ° C temperatūrā.

Pēc tam skalo priekšmetstikliņu trīs reizes pa 5 min ar 1 ml skalošanas bufera.

Atšķaida sekundāro antivielu atšķaidīšanas buferī 1:500. Pēc tam atšķaidīto sekundāro antivielu ielej katrā lauciņā (400 µL/lauciņā), un tad inkubē tumsā 1 stundu istabas temperatūrā. Paraugus pēc tam divas reizes noskalo ar 400 µL skalošanas bufera. Pēc skalošanas pievieno 300 µL atšķaidītā DAPI šķīduma (1 µg/ml) katrā priekšmetstiklīņa lauciņā, un inkubē 2 – 5 minūtes istabas temperatūrā.

Skalo paraugus vienreiz ar PBS un vienreiz ar ūdeni. Tad uzmanīgi uzpilina 1 pilienu ieslēgšanas vides uz mikroskopa priekšmetstiklīņa un uzklāj segstikliņu uz priekšmetstiklīņa, izvairoties no gaisa burbuļiem.

### **2.1.3. Mikroskopēšana**

Iezīmētās šūnas aplūko konfokālajā mikroskopā Nikon C2, un uzņem attēlus programma Nikon C2.

Konfokāla lāzera skenēšanas mikroskops ir mikroskops, ar kura palīdzību var iegūt augstas izšķirtspējas optiskos attēlus. Pati galvenā iezīme ir tāda, konfokālais mikroskops spēj iegūt *in – focus* attēlus no izvēlētā dziļumā, process tiek saukts par optisko sekciju. Attēlus iegūst punktu pa punktam un rekonstruē uz datora, kas ļauj apskatīt attēlus trīsdimensiju veidā. Konfokālajam mikroskopam ir x, y un z asis.

## **2.2. Western blota analīze**

### **2.2.1. Vielas**

Sintētiskais lunasīns no CASLO laboratorijas Aps (Dānijas Tehniskās Universitātes) no Sigma – Aldrich (St. Louis, ASV).

*Western* blota metodei izmantotie reaģenti: RIPA buferis (R0278, Sigma Aldrich, ASV), proteāžu inhibitoru kokteilis (P2714, Sigma – Aldrich, ASV), poliakrilamīda gēla elektroforēzei izmantots proteīna molekulārā svara standarts – Spectra Multicolor Broad Range Ladder (22634, Piercenet, ASV). Bloķēšanai izmantots 5% sausais piens un 0,05% Tween 20 (sc – 2333, Santa Cruz Biotechnology, ASV).

Izmantotās primārās antivielas: trušu poliklonālā anti- $\beta$  aktīns (ab8224, Abcam, Lielbritānija) kā pozitīvo paraugu ievadīšanas kontrole.

Izmantotās sekundārās antivielas: peroksidāzes konjugētā kazas anti- $\beta$  aktīns (A9169, Sigma – Aldrich, ASV), lunasīna sekundārā anti- $\beta$  aktīns (A9169, Sigma – Aldrich, ASV).

Detektēšanai tika izmantoti hemiluminescences ECL Advance šķīdumi A un B (RPN2135, Amersham GE Healthcare, ASV).

### **2.2.2. Šūnu kultūras parauga sagatavošana**

Šūnās ar 1  $\mu$ mol lunasīna inkubēja 3 dienas. Pēc tripsinizēšanas iegūtās šūnu nogulsnes (2 miljoni šūnas), denaturēja ar 25  $\mu$ l SDS-stop bufera 5 min 96 grādos un pēc tam ļāva atdzist uz ledus. SDS-stop bufera sastāvā ir nātrija dodecilsulfāts, kas padara proteīnu negatīvi lādētu, kā arī ir iekrāso tos zilā krāsā un veicina labāku parauga ievadīšanu gēla bedrītē.

### **2.2.3. Gēla elektroforēze un pussausā pārnese**

Proteīni tiek sadalīti pēc to molekulārā svara, izmantojot 10% SDS poliakrilamīda gēlu pie 70 – 80 V sprieguma aptuveni 2 stundas. Vienā no gēla bedrītēm pievieno marķieri kontrolei. Proteīnu daudzums gēlā ir 20 – 40  $\mu$ g/mL.

Tad proteīni tiek pārnesti uz nitrocelulozes membrānas (N8267 – 5EA, Sigma Aldrich, Vācija), izmantojot elektroforēzes metodi, strāvas stiprumu iestata attiecīgi membrānas laukumam. Iepriekš sagriež vatmaņa papīru un nitrocelulozes membrānu patur vismaz 10 minūtes pārnese buferi, lietojot „sviestmaizes” principu, lai padarītu proteīnus pieejamus antivielām. Pārnese notiek aptuveni 45 – 60 min.

### **2.2.4. Bloķēšana un blotēšana ar antivielām**

Lai novērstu membrānas nespecifisko saistīšanos ar antivielu, membrānu bloķē ar 5% sauso pienu un TBS buferi un 0,05% Tween 20 30 min istabas temperatūrā, lai izvairītos no nespecifisko antivielu piesaistes.

Tiek inkubētas primārās antivielas 4° C diennakti atšķaidījumos: lunasīna anti- $\beta$  aktīns 1:2500. Pēc tam membrānu skalo ar TBS buferi un 0,05% Tween 20 istabas temperatūrā pa 15 minūtēm 3 reizes. Tad tiek inkubēta lunasīna sekundārā anti- $\beta$  aktīns istabas temperatūrā 1

stundu. Membrānu skalo vēlreiz ar TBS buferi un 0,05% Tween 20 istabas temperatūrā pa 15 minūtēm 3 reizes.

### **2.2.5. Membrānas attīstīšana**

Lunasīna ekspresijas noteikšanai izmantoja hemiluminescences reaģentus - šķīdumus A un B (RPN2135, Amersham GE Healthcare, ASV), kurus sajauc attiecība 1:1, un kurus vienmērīgi uzklāj uz membrānas, inkubē 1 min, membrānu uzmanīgi noslauka. Gaisma tika detektēta uz CDD kamerām (UVP Bioimaging System, Kanāda), kur iestata laiku, kas var variēt, bet vidēji tika izmantotas 2 min.

### **2.2.6. Datu apstrāde**

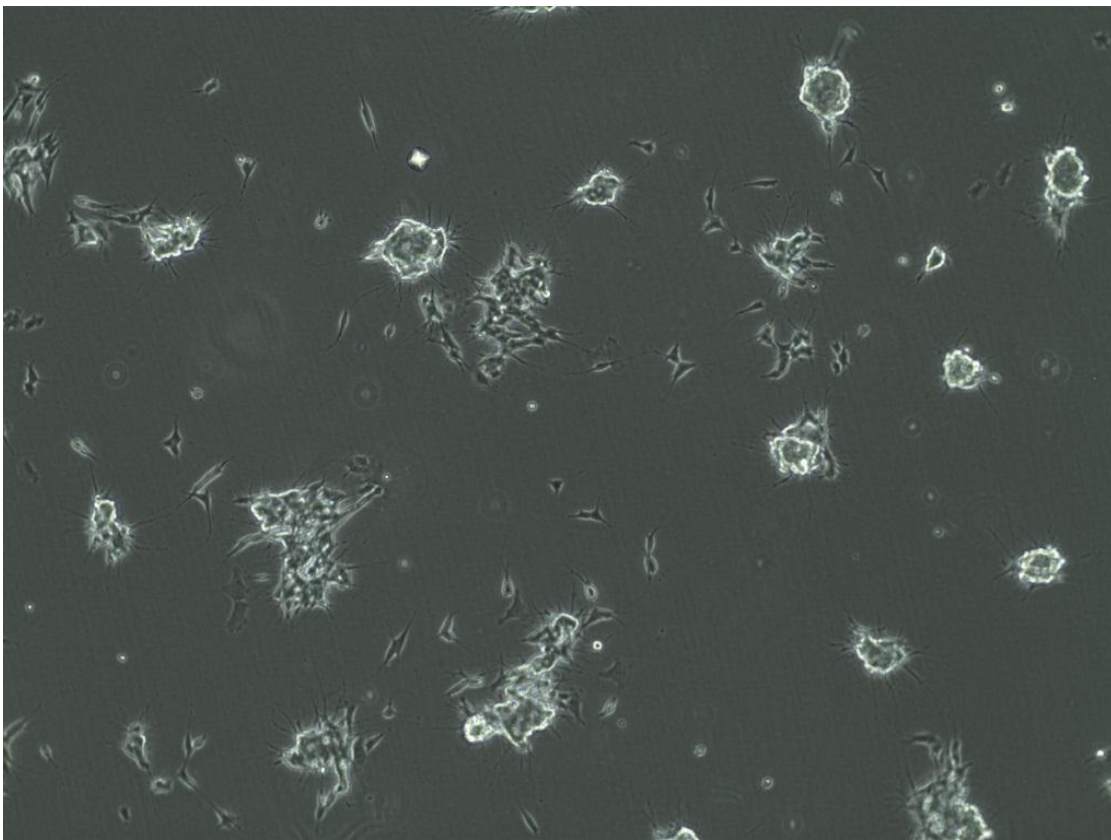
Attēlu analīzei izmantota Image J programma, kur lunasīna ekspresiju izsaka, kā absolūto intensitāti skaitļos, kas ir iezīmētā laukuma un tajā vidējo pikseļu skaitu reizinājums. Eksperimentālā grupa, kur tika ievadīts tikai fizioloģiskais šķīdums, tiek ņemta kā kontrolē, kurai piešķir vērtību 1. Tālāk aprēķina pārējo grupu relatīvo intensitāti (kontrolē/katras grupas absolūto intensitāti).

Statistisko datu analīzei izmantota programma Microsoft Excel.

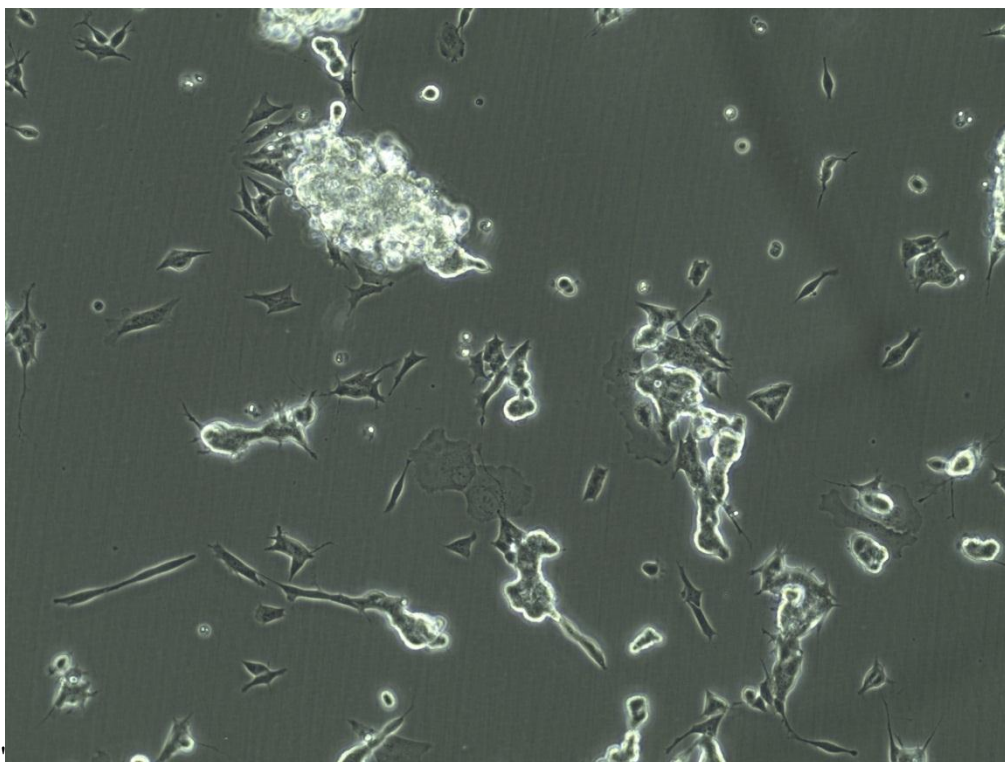
### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. Imūnofluorescences analīze

Attēlā 3.1. parādīta neuroblastomas šūnu līnijas SH-SY5Y šūnu kultūra, šūnās piestiprinājušas pie flakona pamatnes, tām ir izaugumi un šūnas veido sakopojumus. Attēlā 3.2. parādīta neuroblastomas šūnu līnijas SH-SY5Y šūnu kultūra ar lunasīnu (2  $\mu$ M). Tāpat, ka attēlā 3.1. šūnās ir piestiprinājušas pie flakona pamatnes, tām ir izaugumi un šūnas veido sakopojumus. Tas norāda uz to, ka lunasīnam nebija ietekmēs uz šūnu kultūras morfoloģiju.



3.1. att. Neuroblastomas šūnu līnijas SH-SY5Y morfoloģija



3.2. att. Neuroblastomas šūnu līnijas SH-SY5Y šūnu morfoloģija pēc apstrādes ar lunasīnu

Attēlā 3.3. ir parādīts ar lunasīnu 2  $\mu\text{M}$  inkubētas neuroblastomas šūnu līnijas SH-SY5Y konfokāla mikroskopa attēls. Ar zilo iezīmi (DAPI) ir iekrāsots šūnas kodols un zaļā iezīme (FITC) parāda lunasīna antivielas saistīšanos. Kā redzams attēlā, tad lunasīns nav novērojams šūnas kodolā, bet ir tikai apkārt šūnas kodolam, iespējams, ka lunasīna anti-viela lokalizējas citā vietā, ka, piemēram, citoplazmā. No tā var secināt, ka lunasīns, iespējams, nav nonācis neuroblastomas šūnu līnijas SH-SY5Y šūnas kodolos, jo nav izvēlēts optimāls inkubācijas laiks. Mēs šūnas inkubējām ar 2  $\mu\text{M}$  lunasīnu 3 dienas.

Park et. al. pētījumā tika izmantots attīrīts lunasīns no kallusa. Lunasīnu attīrītu no kallusa, pārbaudīja vēža profilakse, izmantojot koloniju veidošanas testu NIH3T3 šūnās. Park et. al. pētījumā šūnās apstrādāja ar 1  $\mu\text{M}$  sintētiska lunasīna un 1  $\mu\text{M}$  attīrīta lunasīna. Pētījumā beigas viņi noskaidroja, ka lunasīns, kas bija attīrīts no kallusa spēja internalizēties peļu fibroblastu šūnās NIH3T3 un lokalizēties kodolā 18 stundas pēc lunasīna ievadīšanas.

Tātad, ka jau noskaidrojam, tad mēs sava eksperimentā šūnās inkubējām ar 2  $\mu\text{M}$  lunasīna, pie tam tas bija sintētiskais lunasīns. Kā zināms, tad Park et. al. pētījumā šūnās tika inkubētas ar 1  $\mu\text{M}$  lunasīna. Un uzzinājām to, ka tikai lunasīns attīrīts no kallusa, kas bija ņemts 1  $\mu\text{M}$ , spēja internalizēties peļu fibroblastu šūnās NIH3T3 un lokalizēties kodolā 18

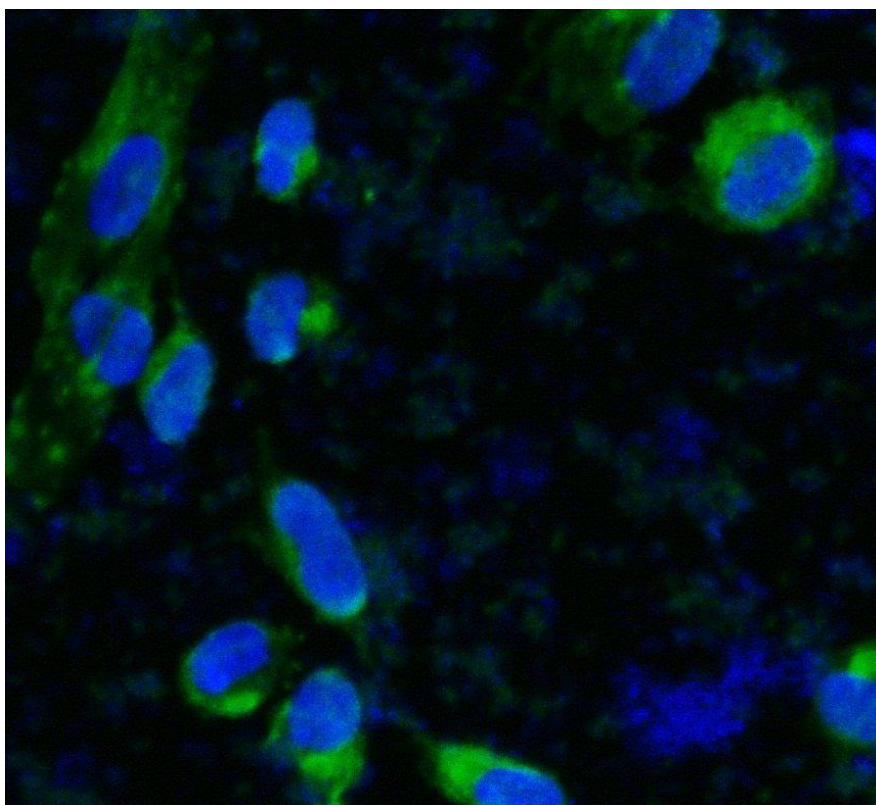
stundas pēc lunasīna ievadīšanas. No šī var secināt, ka, iespējams, tikai lunasīns, kas ir attīrīts, piemēram, no sojas, miežiem vai rudziem spēj pēc kāda noteiktā laikā lokalizēties šūnu kodolā pēc tam, kad ir ievadīts lunasīns. Atšķirīgs ir arī, tas arī cik lielu lunasīna koncentrāciju tiek inkubētas šūnās, tas arī varētu dot atšķirīgus rezultātus.

Hsieh et. al. pētījumā atkal noskaidroja to, ka lunasīns, kas bija attīrīts no miežu sēklām internalizējas peļu fibroblastu NIH3T3 šūnās un lokalizējas kodolā 20 h pēc lunasīna ievadīšanas. Tāpat šī pētījumā ietvaros lunasīns tika atrasts žurku nierēs un aknās pēc tam, kad žurkas bija barotas ar LEB, to vidējās koncentrācijas bija 32,8  $\mu\text{g/g}$  nierēs un 3,5  $\mu\text{g/g}$  aknās. Pētījumā arī noskaidroja, ka lunasīns nebija novērojams asinīs. Lunasīns, kas bija attīrīts no miežiem internalizējas žurku nierēs un aknās, pēc tam, kad žurkās tika barotas ar LEB. Lunasīns, kas bija attīrīts no žurku nierēm un aknām inhibēja yGCN5 aktivitāti apmēram par 20% un 18%, un PCAF aktivitāti apmēram par 25% un 24% pie koncentrācijas 100 nM. No žurku nierēm un aknām attīrītajām lunasīnam inhibitora efekts bija līdzīgs sintētiskā lunasīna inhibitora efektam pie tas pašas koncentrācijas.

Chubb pētījumā ietvaros tika novērots, ka 20  $\mu\text{M}$  lunasīna lokalizējas RWEP-1 un RWEP-2 šūnu perinukleārajā reģionā pēc 3 h un 24 h ievadīšanās, salīdzinot ar kontroles grupu. Tomēr, kad RWEP-2 šūnās saņēma 50  $\mu\text{M}$  lunasīna 24 h, varēja imūnofluorescences mikroskopā novērot, ka lunasīns ir lokalizējies gan kodolā, gan citoplazmā. Kodolā lunasīns vairāk bija lokalizējies transkripcijas aktīvajos centros, kur ir sastopams lunasīns. Iepriekšējos imūnofluorescences pētījumos, kur tika izmantotas NIH3T3 šūnās novēroja, ka lunasīns kopā ar hromatīnu lokalizējas kodolā pēc vienas šūnas cikla dalīšanas procesa, bet to varēja novērot tikai tad, kad šūnas metafāze aktīvi dalījās (Lam et. al., 2003). Kopumā šie rezultāti norāda uz to, ka RWEP-2 šūnās var izstumt lunasīnu no ārpusšūnas telpas un difirenciāli ietekmēt lunasīna ekspresiju uz gēniem (Huang et. al., 2001).

Park et. al. pētījumā lunasīns internalizējas tieši peļu fibroblastu NIH3T3 šūnās un pēc tam arī lokalizējas šo šūnu kodolā un abos gadījumos lunasīns bija attīrīts no kāda auga valsts produkta. Sintētiskais lunasīns neuzrādīja tādus pašus rezultātus, ka lunasīns, kas, piemēram, bija attīrīts no kallusa vai miežu sēklām. Kaut gan Park et. al. pētījumā lunasīns, kas bija attīrīts no kallusa tikpat liela mērā nomāca NADH ražošanu, kā sintētiskais lunasīns. Tad tas liek aizdomāties, kāpēc ir lietas, kur sintētiskajām lunasīnam un lunasīnam, kas, piemēram, ir attīrīts no kallusa, miežiem, sojas, kviešiem uzrāda līdzīgus efektus, ka, piemēram, nomāc NADH ražošanu līdzīgi, vai izraisa līdzīgus inhibitora efektus, bet tikai lunasīns, kas ir attīrīts no sojas, miežiem, kviešiem, rudziem un kallusa spēj lokalizēties vai nu zīdītāju šūnu

kodolos, vai peļu fibroblastu NIH3T3 šūnās (Park et. al., 2007). Tātad, tomēr tas liek domāt, ka lunasīnam, kas attīrīts no auga valsts produkta, tomēr ir kādas īpašības, kas atšķiras no sintētiska lunasīna. Un pateicoties šīm īpašībām, arī atšķiras gala rezultāti. Varētu būt arī tā kā lunasīns, kas ir izolēts no sojas, miežiem, rudziem un kallusa ir dažādas koncentrācijas, līdz ar to tas arī var ietekmēt darba rezultātus. Piemēram, ir noskaidrots, ka sojas sēklu attīstības un dīgšanas posmos lunasīna koncentrācija var tikt ietekmēt. Tika arī noskaidrots, ka lunasīna daudzums ievērojami palielinās sēklu nogatavošanas laikā (Park et. al., 2005; Wang et. al., 2008).



**3.3. att. Neuroblastomas šūnu līnija SH–SY5Y pēc inkubācijas ar lunasīnu 2 $\mu$ M. Lunasīna specifiska antivielas - zaļa iezīme, kodola iezīme DAPI – zila krāsa. (palielinājums 60x)**

Attēlā 3.4. ir parādīta lunasīna uzņemšanas eksperimenta kontrole - neuroblastomas šūnu līnija SH–SY5Y šūnu kultivēšanas barotnē un tālāk apstrādāta ar antivielām un DAPI identiski lunasīna paraugam. Ar zilo iezīmi (DAPI) ir iekrāsots šūnas kodols un zaļā iezīme (FITC) parāda lunasīna antivielas saistīšanos. Šūnās var novērot zaļo iezīmi gan citoplazmā, gan iespējams, šūnas kodolā vai citoplazmas slānītī virs tā. Zaļajai iezīmei vajadzēja parādīties tikai tad, ja šūnā ir nonācis lunasīns, jo mēs izmantojam primāro poliklonālo antivielu, kas ir iegūta imunizējot trušus ar lunasīnu. Tā kā lunasīns šajā eksperimenta lauciņā netika pievienots, tad secinām, ka poliklonālo antivielu saistīšanās ir nespecifiska.

Lunasīna peptīds ir 43 aminoskābju garš (Park et. al., 2005; Galvez et al., 2001; Galvez&,-de Lumen, 1999; Galvez et. al., 1997), tātad teorētiski ir iespējami vairāki antivielu epitopi un motīvi, kas var būt kopīgi ar citiem šūnas proteīniem (Galvez&,-de Lumen, 1999; Rouslahti&,-Pierschbacher, 1986; de Lumen et. al., 2009). Piemēram, lunasīnā ir RGD motīvs, kas atbild par ekstracelulārā matricsa saistīšanos un ir sastopams daudzos šūnas proteīnos, tāpat RGD motīvs ir atbildīgs par lunasīna internalizāciju šūnas kodolā (Ledema, et. al., 2009).

Ir arī noskaidrots, ka lunasīnam līdzīgajos peptīdos 5 un 14 kDa, ir sastopams adhēzijas motīvs, kas sastāv no RGD atlikumiem. Ir zināms arī, ka RGD motīvs ir atbildīgs par to, ka lunasīns var piesaistīties pie ārpusšūnu matricas, kas līdz ar to arī tālāk ļauj lunasīnam internalizēties zīdītāju šūnās (Ledema et. al., 2009). Noskaidroja arī to, ka RGD tripeptīds ir atrodams integrīnu ārpusšūnu matricē, tāpat RGD motīvs ir atrasts uz integrīnu šūnu virsmas proteīniem (Rouslahti, 1996).

Ogawara et. al. pētījumā noskaidroja, ka RGD–PGE modificēts adenovīruss endotēlija šūnās caur  $\alpha\beta3$  integrīnu nomāc NF- $\kappa$ B signālu pārvaldi, kas ietver to, ka tiek samazināta TNF- $\alpha$  inducētais E–selektīns, tāpat tiek samazināta asinsvadu šūnu piesaistīšanas molekulai–1, starpšūnu adhēzijas molekula–1, IL–6, IL–8, un asinsvadu endotēlija augšanas faktors A. Ir arī noskaidrots, ka RGD motīvs, kas atrodas 5 un 14 kDa peptīdos inhibē LPS inducēto iekaisumu makrofāgu šūnu līnija RAW 264.–7.

Ir pierādīts arī, ka lunasīns spēj ietekmēt apoptiskos gēnus, līdz ar to var secināt, ka lunasīnam piemīt pro – apoptiska darbība, ko var attiecināt arī uz RGD motīvu (De Mejia&,-Dia, 2009).

Lucie et. al. pētījumā pierādīja to, ka RGD motīvs ir svarīgs integrīnu mijiedarbība. Tātad arī noskaidroja, ka RGD motīvs spēlē svarīgu lomā tajā, ka piegādā zāles uz konkrētu vietu audzēja angiogēzes gadījumā.

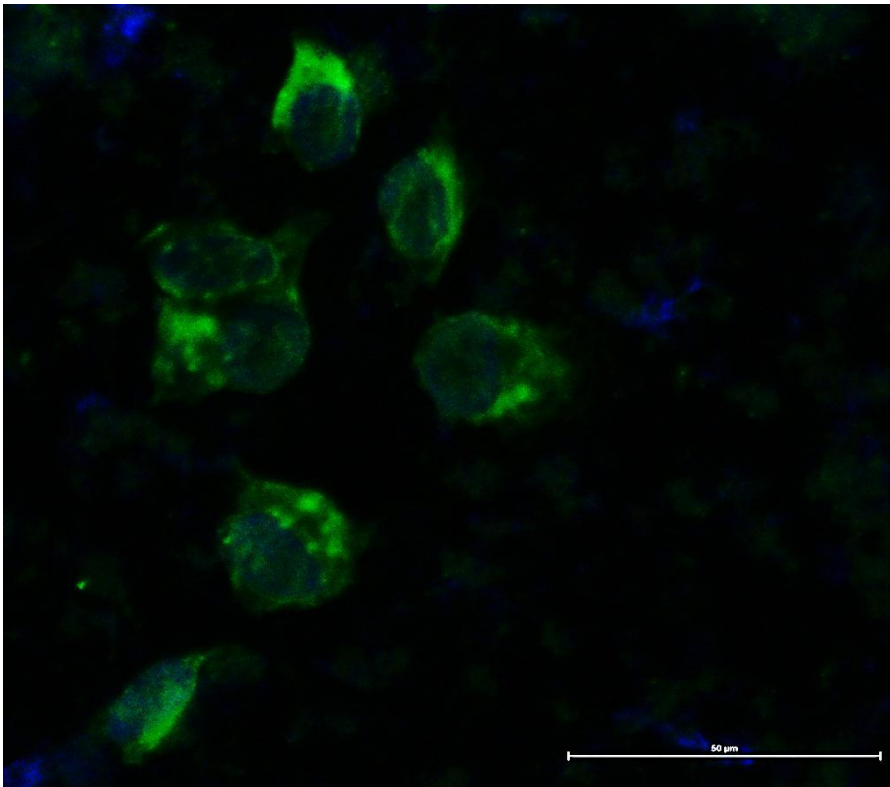
Turklāt ir noskaidrots, ka RGD motīvs kopā ar integrīnu receptoriem veido šūnu adhēzijas atpazīšanas sistēmu (Villard et. al.,2006), kas tad arī ietekmē un regulē šūnu migrāciju, augšanu, diferenciaciju un apoptozi (Lu et. al., 2006).

Buckley et. al. pētījumā atkal novēroja, ka RGD motīvs samazināja limfocītu un leukocītu šūnu izdzīvošanu. Arī šī pētījumā ietvaros noskaidroja, ka lunasīnam un zināmām ķīmijterapijas zālēm, cisplatīnam, pastāv sava starpā sinerģisks efekts. Lunasīna un cisplatīna kombinācijas sinerģiskais efekts inhibēja HT–29 resno zarnu šūnu augšanu, pie lunasīna

koncentrācijām 30 un 60 mikromoli, bet cisplatīns bija dažādās koncentrācijas (Dia&,-de Meijja, 2010). Arī starp lunasīnu un aspirīnu pastāv sinerģiskais efekts. Lunasīna un aspirīna kombinācija atkal ietekmēja krūts vēža šūnās MDA-MB-231 šūnu augšanu (Hsieh et. al., 2010). Tāpat arī lunasīns kombinācija ar IL-12 vai IL-2 spēcīgi iedarbojas uz IFN $\gamma$ , granzīmu B un NK šūnām izraisot sinerģisku efektu (Cheng et. al., 2014). Norādītie rezultāti liecina par to, ka lunasīna efektus var pastiprināt gan zāles, gan interleikīni.

Kā jau iepriekš noskaidrojam, tad lunasīnam struktūra ir sastopams RGD motīvs, tāpat arī lunasīns satur 8 asparagīnskābes atlikumus, kas ir atbildīgi par lunasīna antimitotisko efektu. Pēc tam, kad asparagīnskābes atlikumi ir sasaistījušies ar hipoacetilēto hromatīna reģionu, ka, piemēram, centromērās. Tad, kad asparagīnskābes atlikumi sasaistās ar hipoacetilēto hromatīna reģionu izveidojas kinetohora komplekss, kas tad arī neļauj mikrotubuļiem pievienoties pie centromērām, kas beigas noved pie mitozes apstāšanās un galu galā pie šūnu nāves (Galvez&,-de Lumen, 1999). Kā zināms, tad lunasīna galā poli - asparagīnskābes atlikumi atbild galvenokārt par histona H3 acetilācijas inhibīciju (Ledesma et. al., 2011).

Lunasīns, kas eksogēni pievienots zīdītāju šūnu kultūrām, internalizējas un lokalizējas kodolā, kur piesaistās pie deacetilētiem serdes histoniem H3 un H4 un inhibē šo acetilēšanos no koncentrācijas atkarīgā veidā. Lunasīna histonu acetilēšanās inhibīcija par 25% novērojama jau 10 nM koncentrācijā, bet 80% inhibīcija tiek sasniegta 1  $\mu$ M koncentrācijā. Uzskata, ka lunasīns nogalina šūnas, traucējot histonu acetilēšanās/deacetilēšanās dinamiku. Tumoru supresējošais proteīns Rb iedarbojas uz E2F promoteri un palīdz histonu deacetilāzi (HDAC) noturēt histonus deacetilētā veidā. Onkoproteīns E1A inaktivē Rb un Rb-HDAC komplekss sabrūk. Deacetilētie histoni kļūst pieejami acetilēšanai ar histonu acetiltransferāzēm (HAT). Tieši šajā brīdī parādās lunasīna efekti, jo lunasīns piesaistās pie atbrīvotajiem deacetilētajiem histoniem un konkurē ar HAT. Lunasīna iejaukšanās dēļ gēnu transkripcija tiek bloķēta un šūnās notiek apoptoze (Jeong et. al., 2007; Kim et. al., 2007). Uzskata, ka tad, kad tumora supresori ir inaktivēti, lunasīns varētu darboties, ka surogāttumorsupresors un selektīvi nogalināt šūnas, kuras sāk transformēties. Tāpēc lunasīns ir aktīvāks pret tiem vēža veidiem, kas notiek ar hromatīna modifikācijām. Domā, ka lunasīns saistās pie deacetilētā histona ar negatīvi lādēto poli - D ķēdīti peptīda molekulas C - galā, jo, ja šo fragmentu noņem, tad antimitotiskie lunasīna efekti pazūd. Peptīda N - galam varētu būt nozīme deacetilēto histonu atrašanai (Muceniece et. al., 2010).



**3.4. att. Negatīvā kontrole - neuroblastomas šūnu līnija SH-SY5Y. Lunasīna specifiska antivielas - zaļa iezīme, kodola iezīme DAPI – zila krāsa.**

**Attēls veikts pie 60x palielinājuma, redzamā nogriežņa garums 50  $\mu\text{m}$ .**

Iezīmētās šūnas aplūko konfokālajā mikroskopā Nikon C2, un abus attēlus uzņēma attēlu programmā Nikon C2.

Lunasīna lokalizācija kodolā nebija novērojama neuroblastomas šūnu līnijā SH-SY5Y. Iespējams, ka nepieciešama eksperimenta optimizācija – var izmantot citu šūnu fiksēšanas reaģentu, mainīt lunasīna inkubācijas laiku, bloķēšanas un permeabilizācijas apstākļus, antivielu inkubācijas laiku, intensīvāka skalošana ar augstāku deterģenta koncentrāciju skalošanas buferšķīdumā.

Tāpat, lai imūnofluorescences iegūtie rezultāti būtu precīzi ir ļoti svarīgi izveidot atbilstošu kontroli. Viena no lietām ir, tā kā visos imūnofluorescences eksperimentos ir jāiekļauj negatīva kontrole, kur tiek izmantots inkubācijas buferis bez primāras antivielas, tas nepieciešams, lai pēc tam varētu identificēt nespecifisko sekundāra reaģenta iekrāsošanos. Arī tiek izmantotas papildus kontroles, lai noskaidrotu, ka iekrāsojas primāra antivielas. Papildus kontroles ietver absorbcijas kontroli, izotipa saskaņota kontrole (priekš monoklonālas primārās antivielas, uz mūsu darbu neattiecas, jo mēs izmantojam poliklonālo antivielu) un

audu tipa kontrole. Mūsu eksperimentā sekundārajai antivielai nenovērojām nespecifisku saistību (rezultāti nav parādīti).

Tāpat ir zināms, ka DAPI (2, 4 – diamino – 2 - fenillindols) saistās ar DNS, un ir piemērots kodolā kontrastkrāsvielai. Tā absorbcijas maksimums ir 358 nm un fluorescē zila krāsa pie emisijas maksimuma 461 nm. Ar DAPI kontrastkrās vielas palīdzību var skaidri novērot, ka šūnas lokalizējas kodolā.

Imūnofluorescences rezultātus arī varēja ietekmēt, tas cik ilgi attēli tika izgaismoti, jo ilgāk attēlus izgaismoja ar DAPI vai FITC, jo vairāk paraugos šūnās varēja tikt izdedzinātas. Tāpēc ir ļoti svarīgi, kad strādā ar paraugiem darboties ļoti ātri, nevar ilgi regulēt to, lai būtu atbilstoša pozīcija attēlu uzņemšanai, jo ja ilgāk darbojaties ar paraugiem, jo vairāk šūnu tiek izdedzināts. Un tas arī var ietekmēt rezultātus, kas gala tiek novēroti. Ir daudz un dažādi faktori un apstākļi, kas var ietekmēt darbu, un tos visus nav pilnība iespējams uzskaitīt.

Cam et. al. pētījumā noskaidroja, ka lunasīna internalizācija pieaug un to, ka tas tiek uzsūkts visas šūnās pēc tam, kad šūnas saņēma LPS (pro – inflamatora aģents) un vitronektīnu. Un salīdzinot šos iegūtos rezultātus ar PBS grupu un stimulēto grupu, novēroja, ka lunasīna uzņemšana šūnās ir pieaugusi par 2,5 un 2,9 reizēm, bet grupa, kur LPS un vitronektīns, pieaugums bija tikai par 3,3 reizēm. Tāpat arī šūnās, kas saņēma lunasīnu samazināja  $\alpha\beta3$  integrīna bazālo ekspresiju uz plazmas membrānas virsmas par 1,2, 1,3, 1,4 un 2,0 reizēm salīdzinot ar kontroles grupu. Un imūnofluorescences analīze noskaidroja, ka lunasīna uzņemšana ar katru laikā periodu palielinājās, lai gan vērtības statistiski atšķiras tikai par 1 h. Noskaidroja arī to, ka lunasīns neietekmēja klatrīna ekspresiju uz šūnu membrānas virsmas un to, ka pats lunasīns internalizējas intracelulārajos pūslīšos. Balstoties uz šiem faktiem var secināt, ka tāpat, ka mūsu eksperimentā lunasīns it kā uzsūcas visas šūnās, bet tomēr, kad apskatīja tuvāk imūnofluorescences mikroskopā, tad ieraudzīja, ka lunasīns vairāk internalizējas vai lokalizējas intracelulārajos pūslīšos, bet mūsu gadījumā lunasīns bija novērojams citoplazmā. Pašas beigas eksperimentā ar imūnohistoķīmiskas analīzes palīdzību noskaidroja, ka LPS (10 nM) un vitronektīns (130 nM) veicināja lunasīna internalizāciju šūnā, salīdzinot ar PBS kontroles grupu.

Kā jau iepriekš pieminēju lunasīns ir termostabils, un pat vārot 10 minūtes, tā struktūrā un bioaktivitāte nemainās (Park et. al., 2005). Ir noskaidrots, ka lunasīns sāk sintezēties sojas sēklu aizmetņos 5 nedēļas pēc noziedēšanas, saglabājas nobriedušās sēklīs arī no sojas pupām iegūtos miltos. Lunasīna līmenis mainās atkarībā no auga audzēšanas temperatūras, augsnes un mitruma. Tas norāda, ka lunasīna līmeni sojas pupās var mērķtiecīgi palielināt.

Eksperimentā, kur salīdzināja BBI, izoflavonu un lunasīna līmeņa svārstības auga dziedēšanas gaitā, noskaidroja, ka lunasīns parādās sēklu aizmetņos un to līmeņi palielinās sēklām nobriestot. Un dziedējot sojas pupas, tās mērcējot, barības šķidrums gan gaismā, gan tumsā novēroja, ka lunasīna līmenis samazinājās 7. dienā. Tāpat šī eksperimentā ietvaros noskaidroja, ka pārmērīgs mitrums neveicina lunasīna sintēzi sojā, bet gaismai un vai tumsai ietekme ir maza (Park et. al., 2005; de Lumen, 2005; Wang et. al., 2008). Ir noskaidrots, ka lunasīna koncentrācija produktos ir atkarīga no sojas šķirnes, vides faktoriem un arī no temperatūras (Wang et. al., 2008).

Kā redzam, tad lunasīna internalizāciju un nokļūšanu kodolā var ietekmēt daudz un dažādi faktori.

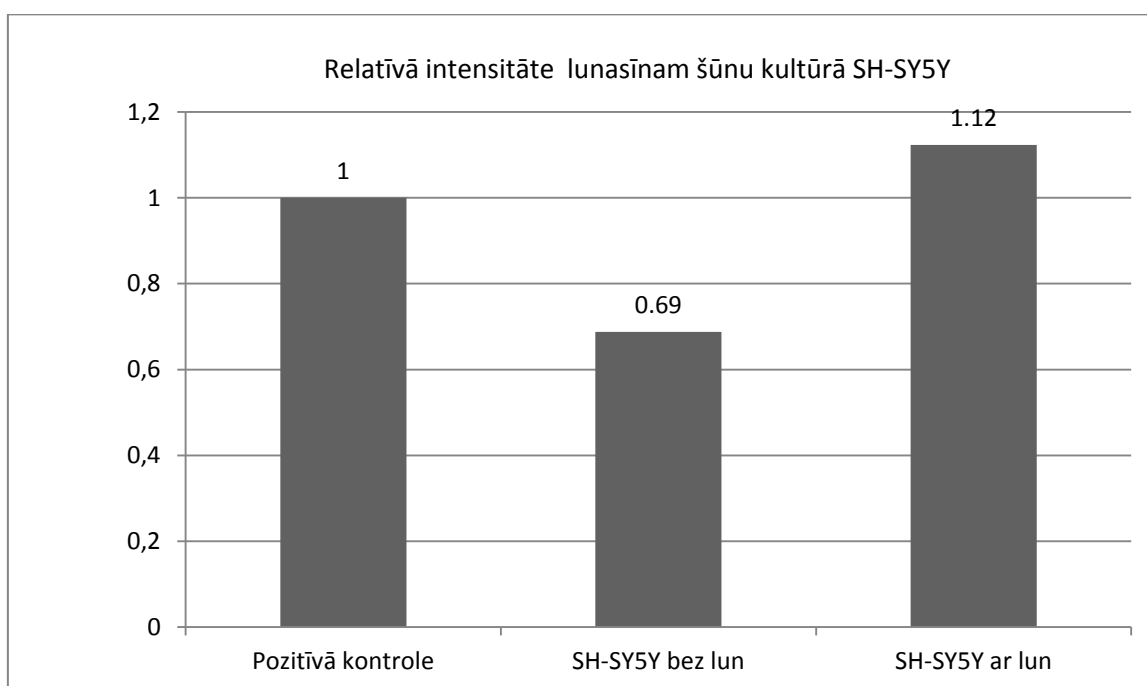
### 3.2. Western blot analīze

Western blots veikts ar šūnu līniju SH-SY5Y. Viena daļa tika apstrādāta ar 1  $\mu$ mol lunasīna, otra daļa šūnu bez lunasīna arī ir pievienota blotam. Visas Western blota gēla bedrītes tika ievadīti 20  $\mu$ L šķīduma (kopējais proteīns + SDS buferis). Pozitīva kontrole bija sintētiskais lunasīns (2,5  $\mu$ g). Gēlā tika ievadīts arī molekulārā svara marķieris. Nākamajās bedrītes tika pievienotas neuroblastomas šūnu kultūrā SH-SY5Y (ar lun) un neuroblastomas šūnu kultūrā SH-SY5Y (bez lun) (attēls 3.5.).



3.5.att. Lunasīna lokalizācija šūnu kultūrā SH-SY5Y (P – pozitīvā kontrole, M – proteīna izmēru marķieris)

Pēc *Western* blota tika veikta iegūtā 3.5. attēla analīze ar ImageJ programmu, kurā iezīmējām interesējošo izmēra svītru, proti, 5,45 kDa un nomērījām šajā laukumā pikseļu daudzumu. Iegūtie rezultāti redzami 3.6. attēlā. Redzams, ka šūnu līnijā SH–SY5Y bez lunasīna ir arī konstatējama nespecifiska lunasīnam līdzīga proteīna detekcija. SH–SY5Y ar lunasīnu intensitāte ir krietni lielāka, tomēr arī šeit redzama nespecifiska piesaiste. Tas liecina, ka antiViela saistās nespecifiski arī ar citiem proteīniem. Tas korelē arī ar imūnfluorescences iegūtajiem datiem, kur izmantota tā pati antiViela.



3.6. att. Lunasīna šūnu kultūras SH–SY5Y relatīvas intensitātes grafiks

AntiViela atpazīst labi konservēto sekvenci RGD, kas ir arī daudziem citiem proteīniem sastopama. Tāpēc precīzākai lunasīna detektēšanai būtu nepieciešama antiViela, kas spēj saistīties specifiski pie interesējošā peptīda vai proteīna.

Hsieh et. al., pētījumā *Western* blota metodi izmantoja, lai noteiktu, vai BBIC sastāva ir sastopams lunasīns, un atklājas, ka ir pie koncentrācijas 74,4 ng/mikrogramu proteīna. Tāpat viņi noskaidroja, ka lunasīns kopā ar BBI sastāda 44% no kopējā BBIC olbaltumvielu skaita. Bez tam ar *Western* blota palīdzību noskaidroja, ka tripsīna inhibitori BBI un KTI pasargā lunasīnu no šķelšanas vai degradācijas. Šajā eksperimentā tika izmantots sintētiskais lunasīns, tāpat, ka mūsu eksperimentā. Iespējams, lai rezultāti būtu atšķirīgi ir nepieciešams, nevis

sintētiskais lunasīns, bet gan jāizolē lunasīns, piemēram, no sojas, jo tad pastāv varbūtība, ka lunasīns uzrādīs savādākus rezultātus.

Piemēram, Park et. al. pētījumā ietvaros tika noskaidrots, ka lunasīns, kas bija izolēts no sojas, miežiem, kviešiem un rudziem spēj lokalizēties zīdītāju šūnu kodolos. Tāpat arī lunasīns, kas bija attīrīts no kallusa spēja internalizēties peļu fibroblastu šūnās NIH3T3 un lokalizēties kodolā 18 stundas pēc lunasīna ievadīšanas. De Mejia ar kolēģiem ir pierādījuši, ka gan sintētiskais lunasīns, gan lunasīns, kas ir attīrīts no sojas pupām, spēj izraisīt līdzīgas bioaktivitātes L1210 leikēmijas šūnām. Tāpat arī Hsieh ar kolēģiem un Jeong ar kolēģiem publicēja datus, ka sintētiskais lunasīns, gan no augu valsts izdalītais lunasīns uzrāda diezgan līdzīgas īpašības.

Pēc šādiem apgalvojumiem ir grūti spriest. Iespējams, ka lunasīns spēj lokalizēties tikai noteiktās šūnu kultūrās vai šūnu līnijās.

Tāpat ir bijis eksperiments, kur tika pārbaudīta makrofāgu šūnu līnijas RAW 264.-7 dzīvotspēja, un atklājās, ka lunasīns makrofāgu šūnu līnijas RAW 264.-7 dzīvotspēju neietekmēja. Kā redzams, tad ir šūnas, kur ir, kaut kāda ietekmē, bet ir šūnas, kur nav.

de Mejia et. al. pētīja lunasīna koncentrāciju dažādos sojas genotipos un viena no metodēm, ko de Mejia izmantoja bija *Western* blota metode, lai identificētu lunasīnu. Pētījumā ietvaros noskaidroja, ka tīrais lunasīns 5,45 kDa un 13 kDa atrodas saistīšanās vietā, pie kuras var saistīties poliklonāla antivielā, un līdz ar to tā spēj dot signālu. Hidrolizētais un izolētais sojas proteīns atkal ir 16 kDa peptīds, un tas liek domāt, ka tas varētu atbilst trimēra lunasīnam. Atkal 30 kDa lielais peptīds varētu būt lunasīna heksamēri. Šajā pētījumā tāpat, ka mūsēja tika izmantota poliklonāla antivielā, vienīgais *Western* blots nenotika uz dzīvām šūnām, ka mūsu gadījumā. Kaut gan tāpat, ka mūsu gadījumā lunasīns bija 5,45 kDa liels. Iespējams, atšķirības ir tāpēc, ka mūsu gadījumā, ka jau pieminēju eksperiments notika uz cilvēku neuroblastomas šūnu līnijas SH-SY5Y, bet de Mejia, et. al. pētījumā eksperiments notika uz augu valsts proteīna ekstraktiem, kas bija izolēti no dažādiem sojas produktiem.

Dia et. al. pētījumā ar *Western* blota metodes palīdzību analizēja proteīnu frakcijas 88 un 104, jo tas parādīja augstu lunasīna koncentrāciju. Pētījumā ietvaros noskaidroja, ka trīs peptīdi, 5 kDa, 8 kDa un 14 kDa, parāda pozitīvu imūnoreakciju peļu monoklonālajā lunasīna antivielā. Dia et. al. noskaidroja arī, ka 5 kDa, 8 kDa un 14 kDa peptīdi ir viens no otra atkarīgi. Tā no šī var spriest, ka arī tas, kāda antivielā tiek izmantota, arī var ietekmēt procesus.

Jeong et. al. pētījumā ar *Western* blota metodes palīdzību noskaidroja lunasīna aizsargājošo efektu pret starpšūnu DNS bojājumiem. Starpšūnu DNS bojājumu vērtēja tā ka noteica fosfora-H2A.X ekspresijas līmenī NIH3T3 šūnās. Gala novēroja, ka lunasīns ar koncentrāciju 0,5 mikromoli samazināja fosfora-H2A.X ekspresiju par 11%, pie koncentrācijas 1 mikromols par 27%, bet pie 5 mikromoliem un 10 mikromoliem par 60% un 82%. Šajā pētījumā lunasīns bija 4,8 kDa liels. Ja salīdzinājuma ar mūsu iegūtajiem datiem *Western* blota, tad atšķirība ir, bet ne pārāk liela, iespējams, atšķirība ir tāpēc, ka Jeong et. al. pētījumā tika izmantotas lunasīns, kas bija izolēts no *Solanum nigrum L.* Tāpat gēlā bedrītes šķīdumi bija pildīti dažādas koncentrācijas, ka, piemēram, 1,6 μL, 0,32 μL un 0,64 μL, bet mūsu eksperimentā atkal visas gēlā bedrītes šķīdumi tika pildīti vienāda koncentrācija, 20 μL.

*Western* blota analīze frakcijai, kas iegūta no 7 kDa peptīda, liecināja par to, ka frakcija 20 saturēja 5 kDa peptīdu ar pozitīvu imūnoreakciju uz peles monoklonālo lunasīna antivielu. Tāpat arī frakcija 18 saturēja 8 kDa peptīdu, kam tāpat, ka 5 kDa peptīdam piemīt pozitīva imūnoreakcija uz peles monoklonālo lunasīna antivielu. Turklāt arī frakcijas 14 divi peptīdi – 8 kDa un 14 kDa, tāpat, ka iepriekšējie frakciju peptīdi pozitīvi reaģēja uz peles monoklonālo lunasīna antivielu (Dia&,-de Mejia, 2009).

Tāpat pētījumā lunasīns tika attīrīts no sojas miltiem. Lunasīns un proteīni tika attīrīti no Superdex30 Prep ar gēlfiltrācijas hromatogrāfijas palīdzību. Pētījumā ietvaros noskaidroja to, ka lunasīns kopīgi eluē arī ar citiem lielmolekulāriem proteīniem. Turklāt noskaidroja, ka lunasīns augstās koncentrācijas ir sastopams frakcijas (molekulu masa) 7, 8 un 9. Tāpat, ka jau daudzos citos pētījumos jau pieminēju 5 kDa proteīnam ir pozitīva imūnreaktīva reakcija, tikai šajā pētījumā pārmaiņas pēc uz truša poliklonālo lunasīna antivielu, nevis uz peļu monoklonālo antivielu (Cavazos et. al., 2012; de Mejia&,-Dia, 2009; Dia et. al., 2009). Vēl šajā pētījumā tika izmantots Laemmli buferis, kas saturēja β – merkaptotetanolu, nevis tā, ka mūsu gadījumā, kur tika izmantots SDS–stop buferis. *Western* blota gala rezultāta novēroja, ka lunasīns bija 5 kDa liels (Searby et. al., 2013).

Tā kā bija veikts tikai viens tāds eksperiments pagaidām ar šūnu kultūru SH – SY5Y, tad pagaidām nav iespējams veikt statistiku, ir vajadzīgi vismaz trīs bloti, lai veiktu statistiku. Tāpat ir jāveic atkārtoti mēģinājumi, lai noskaidrotu, vai rezultāts būs tieši tāds pats. Pastāv jau iespēja, ka nākamajā reizē rezultāts var atšķirties.

Kā jau iepriekš aprakstītie fakti, no tā ļauj secināt, ka ir pētījumi, kur ir novērojami vienādi vai varbūt līdzīgi efekti uz šūnām, bet, tomēr vietām ir novērojamas atšķirības. Līdz ar to beigās katrs no zinātniekiem nonāk pie nedaudz savādāka rezultāta. Piemēram, ka lunasīns,

kas izolēts no kallusa internalizējas šūnās pēc 18 stundām (Park et. al., 2007), bet lunasīns, kas izolēts no miežiem internalizējas šūnā pēc 20 stundām (Hsieh et. al., 2010). Kaut gan atšķirība nav pārāk liela, bet tomēr arī tā ir atšķirība. Vienīgais kopīgais ir tas, ka abas internalizējas peļu fibroblastu NIH3T3 šūnās.

Tādas pašas atšķirības arī ir novērojamas *Western* blota pētījumos, kur lunasīns ir 5,45 kDa liels, bet ir pētījumi, kur ir 4,8 kDa un 5 kDa lieli. Arī ir pētījumi, kur izmanto poliklonālo antivielu (de Mejia et. al., 2004), bet ir vietas, kur izmanto monoklonālo antivielu (Dia&,-de Mejia, 2009). Līdz ar to arī šīs nelielas atšķirības rāda atšķirīgus rezultātus. Pieļaujams, ka SH-SY5Y šūnām, kuras apstrādā ar lunasīnu, nepieciešama monoklonāla antivielu to precīzākai detektēšanai.

Ir arī noskaidrots, ka lunasīnam piemīt hemopreventīvas īpašības, papildus šīm īpašībām lunasīns spēj saistīties ar hipoacetilēto hromatīnu (Galvez&,-de Lumen, 1999; Galvez et. al., 2001). Lai pārbaudītu šo apgalvojumu Huanq ar kolēģiem pētījumā veica imūnoprecipitācijas eksperimentus, kur pārbaudīja, vai lunasīns spēj tieši saistīties ar histonu H4. Imūnoprecipitācijas eksperimenta rezultāti parādīja, ka lunasīns mijiedarbojas ar rH4. Mijiedarbība starp lunasīnu un rH4 bija specifiska. Interesanti vēl bija tas, ka gan lunasīns, gan histona H4 antivielu proteīni migrēja uz vieniem un tiem pašiem kompleksiem, 23 kDa un 50 kDa. Tika arī noskaidrots arī, ka lunasīns un rH4 23 kDa liels proteīna komplekss ir monomēra forma un 50 kDa liels proteīna komplekss ir dimēra forma. Kaut arī šī interpretācija bija apstiprināta vairākos eksperimentos, tomēr rezultāti norāda, ka lunasīns ir cieši saistīts ar rH4 reakcijas procesiem.

Lunasīnam piemīt ne tikai pretiekaisuma un pretaudzēja efekts, bet tam arī piemīt holesterīna samazinošais efekts.

Lai gan tirgū ir sastopami daudzi bioaktīvi dabas produkti, kas pretendē uz holesterīna līmeņa samazinošo efektu, daudziem no šiem produktiem trūkst zinātnisku pierādījumu un tāpat nav noskaidrots to iedarbības mehānisms, lai pamatotu to efektu. Jaunākie fakti liecina par to, ka sojas peptīds lunasīns ir galvenais sojas proteīna komponents, kas ir atbildīgs par holesterīna samazinošo efektu. Arvien vairāki pētījumi liecina par to, ka peptīds lunasīns ir saistīts ar sirds un asinsvadu slimībām. Kā zināms, tad lielākā daļa holesterīna tiek ražots aknās ar HMG-CoA reduktāzes gēna palīdzību. Ir arī zināms fakts, ka statīni pārsvara bloķē HMG-CoA reduktāzi, bet statīni bieži vien nobloķē pārāk daudz holesterīna. Līdz ar to beigas tas var novest pie nopietnām blakusparādībām, bet cilvēkiem ir nepieciešams noteikts holesterīna daudzums, lai nodrošinātu pareizu šūnu funkciju darbošanos, ka, piemēram,

saglabāt šūnu membrānas integritāti un hormonu ražošanu. Saskaņā ar Galvez izteikto secinājumu lunasīns darbojas atšķirīgi, to ir paredzēts dot agrākā posmā, nekā statīnus, un līdz ar to lunasīns arī pilnībā nebloķē HMG-CoA reduktāzes darbību. Lunasīns arī demonstrē izcilu darbību sirds un asinsvadu slimībās (Janet Poveromo, 2012, Pieejams internetā: <http://www.soylabs.com/Portals/0/NIE%20Cholesterol%20Article.pdf>).

Tātad, lai noskaidrotu lunasīna kancerogēneses efektu, ko inducē MCA (ķīmiskais kancerogēns), tika pārbaudīta koloniju veidošanas *in vitro* NIH3T3 šūnām. Tika novērots, ka šūnās, kuras nesaņēma neko, un kuras saņēma 1  $\mu$ M lunasīna bija izveidojušas dažas kolonijas, bet šūnās, kuras saņēma MCA bija izveidojušas kolonijas vidēji 35 kolonijas/lauciņā. Šūnās, kuras saņēma 1  $\mu$ M lunasīna un MCA koloniju bija novērojami par 54,3% vairāk, nekā šūnās, kuras saņēma tikai MCA. Tika novērtēta arī lunasīna ietekmē uz šūnu ciklu, tika pārbaudīts kādu ietekmi tas rada uz p21, p15INK4b, ciklīnu D1, CDK4 un fosforu – Rb (ser780) ekspresijas līmeni, kad klāt ir un nav MCA vai lunasīns, attīrīts no miežiem. Pētījumā rezultāti parādīja, ka lunasīnam ir ietekmē uz p21 proteīnu ekspresijas līmeni NIH3T3 šūnās, kas veido kolonijas, kuras inducēja MCA (Hsieh et. al., 2010). Pētījumā ietvaros noskaidroja arī, ka MCA pievienošana šūnās samazina p21 proteīnu ekspresijas līmeni par 24%, salīdzinot ar kontroles grupu. Un kad tika pievienots 1  $\mu$ M lunasīna šūnās, kuras saņēma MCA novēroja, ka p21 proteīna ekspresijas līmenis palielinājās par 24% un 48%, salīdzinot ar kontroles grupu un grupu, kur MCA bija viens pats. Turklāt novēroja, ka MCA uz NIH3T3 šūnām nomāca p15INK4b proteīna ekspresiju par 5%, salīdzinot ar kontroles grupu. Toties šūnām, kuram pievienoja lunasīnu, kas iepriekš saņēma MCA, notika pilnīgi pretējs efekts p15INK4b proteīnu ekspresijas līmenis uzlabojas par 4%, salīdzinot ar kontroles grupu, kur MCA bija viens pats. Tika arī noskaidrots, ka ciklīna D1 ekspresijas līmenis par 85% palielināja MCA iedarbību, salīdzinot ar neapstrādāto šūnu kontroles grupu. Bet toties 1  $\mu$ M lunasīna samazināja ciklīna D1 ekspresijas līmeni par 98%. Šūnās, kas bija apstrādātas ar MCA un MCA + lunasīns vispār neietekmēja CDK4 ekspresijas līmenī. Tāpat pētījumā rezultāti uzrādīja, ka lunasīns samazina Rb fosforilāciju, kuru izraisīja MCA, par 45% (Hsieh et. al., 2010).

Tātad, lai noskaidrotu vai lunasīns inhibē vai nomāc kancerogenitāti, tika veikts *in vitro* eksperiments uz normālam, netumorigēnām C3H10T1/2 (C3H) šūnām. DMBA (7, 12 – dimetilbenzenantracēns) un MCA tika izmantoti, lai izraisītu koloniju veidošanos (Reznikoff et. al., 1973). Sojas BBI ir iepriekš pierādījis savas spējas attiecība uz to, ka spēj inhibēt koloniju veidošanos *in vitro* (Kennedy, 1993), tālab BBI izmantoja kā kontroli. 125 nM lunasīna samazināja ar DMBA apstrādāto C3H šūnu efektivitāti par 80%, salīdzinot ar

pozitīvo kontroles grupu. Antitransformācijas efekts lunasīnam bija ievērojami lielāks, nekā ekvimolāram BBI, kas samazināja ar DMBA apstrādāto C3H šūnu efektivitāti par 37%. 24 h ārstēšana ar 10 nM lunasīna samazināja transformācijas efektu par 69%, salīdzinot ar pozitīvo kontroli. Toties ārstēšana ar 100 nM lunasīna transformācijas efektu samazināja par 84%, bet palielināja efektu pie 1 un 10 μM lunasīna par 88 un 90%. Tas liek domāt, ka lunasīns ierobežota daudzuma nonāk šūnā, bet ārēja vide lunasīna daudzums ir palielināts, kam līdz ar to ir būtiska ietekme uz internalizāciju (Galvez et. al., 2001).

Kā redzam, tad lunasīnam piemīt daudz dažādu efektu. Pateicoties šiem daudzajiem efektiem zinātnieki liek lielas cerības uz to, ka dienas lunasīns varētu būt labs medikaments, kas palīdzētu cilvēkiem cīnīties ar iekaisumu, vēzi un pat ar aptaukošanos. Protams, ir vēl jāiegulda ļoti liels darbs, lai kārtīgi noskaidrotu visu par lunasīna darbības mehānismiem un efektiem. Tāpat ir jāveic pētījumi uz cilvēkiem, jo pagaidām eksperimenti ir veikti tikai uz dzīvniekiem un uz dažādām šūnu līnijām. Pētījumi uz cilvēkiem nepieciešami tāpēc, lai eksperimentu ietvaros noskaidrotu, kādas blakusparādības lunasīns varētu izraisīt lietošanas laikā. Varētu paiet krietni daudz laikā, līdz lunasīns nonāk aptieku plauktos, ka jauns medikaments, kas palīdz pret vēzi un iekaisumu. Bet cerības jau vienmēr paliek, un, iespējams, nākotnē varēs mazāk novērot cilvēku saslimstību ar vēzi un citām slimībām, ka, piemēram, sirds un asinsvadu slimībām. Un, iespējams, lunasīnam atradīs arī daudz citus jaunus efektus.

#### 4. SECINĀJUMI

1. Lunasīns neietekmēja neuroblastomas SH–SY5Y šūnu morfoloģiju *in vitro* kultūrā.
2. Ar imūnofluorescences metodi noskaidrojām, ka lunasīns tika uzņemts neuroblastomas šūnu līnija SH–SY5Y un lokalizējas citoplazmā.
3. *Western* blota analīzē novērojām, ka neuroblastomas šūnās SH–SY5Y ir konstatējama nespecifiska lunasīnam līdzīga proteīna detekcija.
4. Ar lunasīnu apstrādātas neuroblastomas SH–SY5Y šūnās ar *Western* blota metodi konstatējām augstākas intensitātes lunasīna izmēram atbilstošu 5,45 kDa proteīna svītru, tomēr bija novērojamas arī nespecifiskas lielāka izmēra proteīnu svītras.
5. Iespējams, ka precīzākai lunasīna detektēšanai būtu nepieciešama antivielā, kas spēj saistīties specifiski pie interesējošā peptīda vai proteīna, vai arī jāoptimizē eksperimenta apstākļi ar jau esošo antivielu.

## PATEICĪBAS

Vēlos izteikt ļoti lielu pateicību savai darba vadītājai asociētai profesorei Unai Riekstiņai par atsaucību, padomiem un palīdzību darba tapšanas laikā. Tāpat gribu izteikt ļoti lielu paldies Ulrikai Beitnerei par palīdzību ar *Western blotu* un par padomiem darba tapšanas laikā, un Kasparam Jēkabsonam par palīdzību mikroskopēšanā.

Liels paldies maniem draugiem un īpašs paldies manai ģimenei par izpratni un morālo atbalstu darba tapšanas laikā!

## 5. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

**Ali, A. A., Velasquez, M. T., Hansen, C. T., Mohamed, A. I., Bhatena, S. J.** Effects of soybean isoflavones, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes. *J Nutr Biochem* 2004;15: 583-590.

**Allison, D. B., Gadbury, G., Schwartz, L. G., Murugesan, R., et. al.** A novel soy-based meal replacement formula for weight loss among obese individuals: a randomized controlled clinical trial. *Eur J Clin Nutr* 2003, 57:514-522.

**Aoyama, T., Fukui, K., Takamatsu, K., Hashimoto, Y., Yamamoto, T.** Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition* 2000; 16: 349-354.

**Banz, W. J., Davis, J., Peterson, R., Iqbal, M. J.** Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rats. *Obes Res* 2004; 12: 1907-1913.

**Berhow, M. A., Kong, S. B., Vermillion, K. E., Duval, S. M.** Complete quantification of group A and group B soyasaponins in soybeans. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 2035-2044.

**Bosello, O., Cominacini, L., Zocca, I., Garbin, U., et. al.** Short- and long-term effects of hypocaloric diets containing proteins of different sources on plasma lipids and apoproteins of obese subjects. *Ann Nutr Metab* 1998; 32: 206-214.

**Brehm, A., et. al.** Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature (Lond.)*, 1998, 391: 597-601.

**Buckley, C.D., Pilling, D., Henriquez, N.V., Parsonage, G., et. al.** RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature*, 397 (1999), pp. 534-539.

**Caldwell, C. R., Britz, S. J., Mirecki, R. M.** Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1125-1129.

**Caligiuri, M. A.** Human natural killer cells. *Blood*, 2008, N 3, vol. 112, p. 461 – 469.

**Cam, A., Sivaguru, M., Gonzalez de Mejia, E.** Endocytic Mechanism of Internalization of Dietary Peptide Lunasin into Macrophages in Inflammatory Condition Associated with Cardiovascular Disease. *Plos one*, 2013, 8(9): e72115.

**Candido, E. P., Reeves, R., and Davie, J. R.** Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell*, 1978, 14: 105-113.

**Cavazos, A., Morales, E., Dia, V.P., de Mejia, E. G.** Analysis of lunasin in commercial soybean products and an improved method of purification. *Journal of Food Science*, 77 (2012), pp. C539-C545.

**Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., et. al.** Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood*, 2001, N 10, vol. 97, p. 3146 – 3150.

- Cheng, H. C., Lewis, D., Tung, C. Y., et. al.** Soypeptide lunasin in cytokine immunotherapy for lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2014, N 3, vol. 63, p. 283 – 295.
- Chubb, J. R.** Gene activation at the edge of the nucleus. *EMBO J.* 2009; 28:2145–2146.
- Dave, D., Eason, R. R., Till, S. R., Geng, Y., et. al.** The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. *Carcinogenesis*, 2005, N 10, vol. 26, p. 1793 – 1803.
- Dia, V. P., Torres, S., de Lumen, B. O., Erdman, J. W. Jr., De Mejia, E. G.** Presence of lunasin in plasma of men after soy consumption. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(4):1260–1266.
- Dia, V. P., Wang, W., et. al.** Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, 2009, N 1, vol. 114, p. 108 – 115.
- Dietze-Schroeder, D., Sell, H., Uhlig, M., Koenen, M., Eckel, J.** Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes* 2005; 54: 2003-2011.
- DePinho, R. A.** The cancer-chromatin connection. *Nature (Lond.)*, 1998, 391: 533–536.
- Dyck, J. R., Berthiaume, L. G., Thomas, P. D., Kantor, P. F., Barr, A. J., et. al.** Characterization of rat liver malonyl-CoA decarboxylase and the study of its role in regulating fatty acid metabolism. *Biochem J* 2000; 350: 599-608.
- Ferrari, R., Pellegrini, M., Horwitz, G. A., Xie, W., et. al.** Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. *Science*. 2008; 321:1086–8.
- Fukui, K., Aoyama, T., Nakamori, T., Hashimoto, Y., et. al.** Effect of soy and milk whey protein isolates and their hydrolysates on weight reduction in genetically obese mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 2594-2600.
- Fu, Y., Luo, N., Klein, R. L., Garvey, W. T.** Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 2005; 46:1369-1379.
- Galvez, A. F., Revilla, M. J. R., de Lumen, B. O.** A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA (accession No. AF005030). *Plant Register #PGR97-103. Plant Physiol.* 1997;114:1567–9.
- Galvez, A. F., de Lumen, B. O.** A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 1999;17:495–500.
- Galvez, A. F., Chen, N., Macasieb, J., et al.** Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation. *Cancer Res.* 2001;61:7473–8.
- Garcia, M. C., Torre, M., Marina, M. L., Laborda, F.** Composition and characterization of soybean and related products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; 37: 361-391.
- Grieshop, C. M., Fahey, G. C. Jr.** Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2669-2673.

**Grieshop, C. M., Kadzere, C. T., Clapper, G. M., Flickinger, E. A., et. al.** Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7684-7691.

**Grunstein, M.** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature (Lond.)*, 1997, 389: 349–352.

**Gudbrandsen, O. A., Wergedahl, H., Mork, S., et. al.** Dietary soya protein concentrate enriched with isoflavones reduced fatty liver, increased hepatic fatty acid oxidation and decreased the hepatic mRNA level of VLDL receptor in obese Zucker rats. *Br J Nutr* 2006; 96:249-257.

**Haytowitz D. B., Mathews, R. H.** Legumes and legume products. Washington, DC: US Department of Agriculture. 1986.

**Hsieh, C. C., Ledesma, B. H., et. al.** Complementary roles in cancer prevention: protease inhibitor makes the cancer preventive peptide lunasin bioavailable. *Plos one*, 2010, N 1, vol. 5, p. 8890.

**Hsieh, C. C., Ledesma, B. H., de Lumen, B. O.** Lunasin, a novel seed peptide, sensitizes human breast cancer MDA – MB – 231 cells to aspirin – arrested cell cycle and induced apoptosis. *Chemico – Biological Interactions*, 2010, N 2, vol. 186, p. 127 – 134.

**Huanq, L., Galvez, A. F., Maqbanua, M. M., Dawson, K., Rodriquez, R. L.** Differential Expression of Thrombospondin (THBS1) in Tumorigenic and Non-Tumorigenic Prostate Epithelial Cells in Response to a Chromatin-Binding Soy Peptide. *Nutrition and cancer*, 2011, N 4, vol. 64, p. 623 – 636.

**Hubert, J., Berger, M., Dayde, J.** Use of simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: study of saponin and isoflavones variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 3923-3930.

**Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A., Tanaka, T.** Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J Nutr* 1986;116: 190-197.

**Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K., Ikeda, H.** Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr* 1996; 126: 380-388.

**Iritani, N., Sugimoto, T., Fukuda, H., Komiya, M., Ikeda, H.** Dietary soybean protein increases insulin receptor gene expression in male Wistar fatty rats when dietary polyunsaturated fatty acid level is low. *J Nutr* 1997; 127: 1077-1083.

**Jeong, H. J., Park, J. H., Lam, Y., de Lumen, B. O.** Characterization of lunasin isolated from soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, N 27, vol. 51, p. 7901 – 7906.

**Jeong, H. J., Jeong, J. B., Kim, D. S., de Lumen, B. O.** Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide Lunasin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, N 3, vol. 55, p. 632 – 637.

**Jeong, H. J., Jeong, J. B., Kim, D. S., et al.** The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Lett.* 2007;255:42–48.

**Jeong, J. B., Jeong, H. J., Park, J. H., Lee, S. H., et. al.** Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, N 26, vol. 55, p. 10707 – 10713.

**Jeong, H. J., Jeong, J. B., et. al.** Lunasin is prevalent in barley and is bioavailable and bioactive in in vivo and in vitro studies. *Nutrition and Cancer*, 2010, N 8, vol. 62, p. 1113 – 1119.

**Jeong, J. B., de Lumen, B. O., Jeong, H. J.** Lunasin peptide purified from *Solanum nigrum* L. protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Letters*, 2010, N 1, vol. 293, p. 58 – 64.

**Kennedy, A. R.** Cancer prevention by protease inhibitors. *Prev. Med.*, 1993, 22: 796–811.

**Kirk, E. A., Sutherland, P., Wang, S. A., Chait, A., Leboeuf, R. C.** Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 1998; 128: 954-959.

**Komuro, A., Yashiro, M., Iwata, C., et. al.** Diffuse-type gastric carcinoma: progression, angiogenesis, and transforming growth factor beta signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:592–604.

**Kutney, S. N, Hong, R., Macfarlan, T., Chakravarti, D.** A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-I $\beta$  in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2004; 279:30850–55.

**Lam, Y., Galvez, A. F., de Lumen, B. O.** Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not inhibit growth of immortalized and established cancer cell lines. *Nutrition and Cancer*, 2003, N 1, vol. 47, p. 88 – 94.

**Ledesma, B. H., Hsieh, C. C., de Lumen, B. O.** Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*, 2009, N 2, vol. 30, p. 426 – 430.

**Ledesma, B. H., Hsieh, C. C., de Lumen, B. O.** Concentration of Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor in US commercial soy foods. *Food Chem*, 2009, 115: 574–580.

**Lee, S. O., Simons, A. L., Murphy, P. A., Hendrich, S.** Soyasaponins lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in female golden Syrian hamsters. *Exptl Biol Med* 2005; 230: 472-478.

**Lihn, A. S., Pedersen, S. B., Richelsen, B.** Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* 2005; 6:13-21.

**Ljunggren, H. G, Malmberg, K. J.** Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev.* 2007;7(5):329–339.

**Lovati, M. R., Allievi, L, Sirtori, C. R.** Accelerated early catabolism of very low density lipoprotein in rats after dietary soy protein. *Atherosclerosis* 1985; 56: 243-246.

- Lu, X., Lu, D., Scully, M.F., Kakkar, V.V.** Integrins in drug targeting - RGD templates in toxins. *Curr. Pharm. Des.*, 12 (2006), pp. 2749–2769.
- Lucie, S., Elisabeth, G., Stephanie, F., Guy, S., Amandine, H., et. al.** Clustering and internalization of integrin alpha(v)beta(3) with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol. Ther.*, 17 (2009), pp. 837–843.
- de Lumen, B. O.** Lunasin: a cancer – preventive soy peptide. *Nutrition Reviews*, 2005, N 1, vol. 63, p. 16 – 21.
- Luo, R. X., Postigo, A. A., and Dean, D. C.** Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, 1998, 92: 463–473.
- Luo, R. X., Dean, D. C.** Chromatin Remodeling and Transcriptional Regulation. *Journal of National Cancer Institute*, 1999, N 15, vol. 91, p. 1288 – 1294.
- Lupov, I. P., Voiles, L., Han, L., Schwartz, A., De La Rosa, M., et. al.** Acquired STAT4 deficiency as a consequence of cancer chemotherapy. *Blood*, 2011, 118 (23): 6097–6106.
- Managhi-Jaulin, L., et. al.** Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature (Lond.)*, 1998, 391: 601–605.
- Manzoni, M. S., Rossi, E. A., Carlos, I. Z., et. al.** Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *Nutrition* 2005; 21: 1018-1024.
- de Mejia, E. G., Vasconez, M., de Lumen B. O., Nelson, R.** Lunasin Concentration in Different Soybean Genotypes Commercial Soy Protein and Isoflavone Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, N 52, p. 5882 – 5887.
- de Mejia, E. G., Dia, V. P.** Lunasin and lunasin – like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-κB pathway in the macrophage. *Peptides*, 2009, N 12, vol. 30, p. 2388 – 2398.
- de Mejia, E. G., Wang, W., Dia, V. P.** Lunasin, with an arginine-glycine - aspartic acid motif, causes apoptosis to L1210 leukemia cells by activation of caspase-3. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54:406–414.
- Mezei, O., Banz, W. J., Steger, R. W., et. al.** Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr* 2003;133:1238-1243.
- Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., et. al.** Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005;105(8):3051–3057.
- Morifuji, M., Sanbongi, C., Sugiura, K.** Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats. *Br J Nutr* 2006; 96:469-475.
- Muceniece, R., Kirhnere, I., Nakurte, I., et. al.** Lunasīns – no pārtikas augiem izolēts peptīds ar pretvēža un pretiekaisuma darbību. *Latvijas ārsts*, 2010, Nr. 7/8, 57 – 59 lpp.

**Mullen, E., Brown, R. M., Osborne, T. F., Shay, N. F.** Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in HepG2 cells. *J Nutr* 2004; 134: 2942-2947.

**Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., et. al.** Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. *J Nutr* 1999;129:1725-1730.

**Nagasawa, A., Fukui, K., Funahashi, T., Maeda, et. al.** Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res* 2002; 34:635-639.

**Nakurte, I., Klavins, K., Kirhnere, I., u.c.** Discovery of lunasin peptide in triticale (X Triticosecale Wittmack). *Journal of Cereal Science*, 2012, N 2, vol. 56, p. 510 – 514.

**Nakurte, I., Kirhnere, I., Namniece, J., u.c.** Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 2013, N 3, vol. 57, p. 319 – 324.

**Nevins, J. R.** E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* (Wash. DC), 1992, 258: 424–427.

**Oakenfull, D. G., Topping, D. L., Illman, R. J., Fenwick, D. E.** Prevention of dietary hypercholesterolaemia in the rat by soya bean and quillaja saponins. *Nutr Rep Int* 1984; 29:1039–1041.

**Ogawara, K., Kuldo, J. M., Oosterhuis, K., et. al.** Functional inhibition of NF- $\kappa$ B signal transduction in  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin expressing endothelial cells by using RGD-PEG-modified adenovirus with a mutant I $\kappa$ B gene. *Arthr Res*, 8 (2006), pp. R32–R41.

**Pabona, J. M. P., Dave, B., Su, Y., Montales, M. T. E., et. al.** The soybean peptide lunasin promotes apoptosis of mammary epithelial cells via induction of tumor suppressor PTEN: similarities and distinct actions from soy isoflavone genistein. *Genes & nutrition*, 2013, N 1, vol. 8, p. 79 – 90.

**Park, J. H., Jeong, H. J., de Lumen, B. O.** Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. *J Agric Food Chem*. 2005 Oct 5;53(20):7686-7690.

**Rahal, O. M., Simmen, R. C. M.** PTEN and p53 cross-regulation induced by soy isoflavone genistein promotes mammary epithelial cell cycle arrest and lobuloalveolar differentiation. *Carcinogenesis*, 2010, N 8, vol. 31, p. 1491 – 1500.

**Reznikoff, C. A., Bertram, J. S., Brankow, D. W., Heidelberger, C.** Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res.*, 1973, 33: 3239–3249.

**Rouyer, I. A., Takhashi, Y., Ide, T.** Dietary phospholipid-dependent reductions in gene expression and activity of liver enzymes in fatty acid synthesis in fasted-refed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo) 1999; 45:287-302.

**Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D.** Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*, 1986, N 4, vol. 44, p. 517 – 518.

- Ruoslahti, E.** RGD and other recognition sequences for integrins. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 12 (1996), pp. 697–715.
- de la Rosa, A. P. B., Sánchez, C. S., Galván M.F. L., de Lumen, B.O., et. al.** Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, N 4, vol 56, p. 1233 – 1240.
- Schiltz, R. L., Mizzen, C. A., Vassilev, A., Cook, R. G., Allis, C. D., Nakatani, Y.** Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem*. 1999; 274:1189–92.
- Scholzen, T., Gerdes J.** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, N 3, vol. 182, p. 311 – 322.
- Searby, S. F., Dia, V. P., del Hierro, F. L., Garcia, G., de Mejia, E. G.** Structural property of soybean lunasin and development of a method to quantify lunasin in plasma using an optimized immunoassay protocol. *Food Chemistry*, 2013, N 1, vol. 138, p. 334 – 341.
- Seo, S., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S, Chakravarti, D.** Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the Set oncoprotein. *Cell*. 2001; 104:119–130.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., Parvathy, S. S.** Role of nitric oxide in inflammatory disease. *Inflammopharmacology*, 2007, N 6, vol. 15, p. 252 – 259.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., Hayakawa, Y.** Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev*, 2004, vol. 202, p. 275 – 293.
- Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T., Allis, C. D.** Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:1237–41.
- Srivastava, S., Lundqvist, A., Childs, R. W.** Natural killer cell immunotherapy for cancer: a new hope. *Cytotherapy*. 2008;10(8):775–783.
- Struhl, K.** Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.*, 1998, 12: 599–606.
- Tovar, A. R., Torre-Villalvazo, I., Ochoa, M., et. al.** Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res* 2005; 46: 1823-1832.
- Varier, R. A, Swaminathan, V., Balasubramanyam, K., Kundu, T. K.** Implications of small molecule activators and inhibitors of histone acetyltransferases in chromatin therapy. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68:1215–20.
- Velasquez, M. T., Bhatena, S. J.** Role of dietary protein in obesity. *International Journal of Medical Sciences*, 2007, N 2, vol. 4, p. 72 – 82.
- Villard, V., Kalvuzhiv, O., Riccio, O., Potekhin, S., et. al.** Synthetic RGD-containing alpha-helical coiled coil peptides promote integrin-dependent cell adhesion. *J. Pept. Sci.*, 12 (2006), pp. 206–212.

**Wang, H. J., Murphy, P. A.** Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 1666-1673.

**Wang, H. J., Murphy, P. A.** Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 1674-1677.

**Wang, W., Dia, V. P., et. al.** Analysis of soybean protein- derived peptides and the effect of cultivar, environmental conditions, and processing on lunasin concentration in soybean and soy products. *Journal of AOAC International*, 2008, N 4, vol. 91, p. 936 – 946.

**Weinberg, R. A.** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995, 81: 323–327.

**Xiao, C. W., Wood, C., Huang, W., L'Abbe, M. R., et. al.** Tissue-specific regulation of acetyl-Co A carboxylase gene expression by dietary soya protein intake in rats. *Br J Nutr* 2006, 95:1048-1054.

**Young, V. R.** Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J Am Diet Assoc* 1991; 91: 828-835.

### **Elektroniskie materiāli**

**Poveromo, J.** Progress in the cholesterol puzzle [tiešsaiste]. 2012 – [atsauce 22.04.2014.]. Pieejams internetā: <http://www.soylabs.com/Portals/0/NIE%20Cholesterol%20Article.pdf>.

US Department of Agriculture Nutrient Data Laboratory. USDA-Iowa State University database on the isoflavones contents of foods. Accessed 28 August 2002. Pieejams internetā: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/data/isoflav.html>.

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs „Lunasīna lokalizācija neuroblastomas šūnu līnijā SH – SY5Y” 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.

Autore: Sigita Reinika

\_\_\_\_\_

paraksts

datums

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Darba vadītāja: profesore Dr. biol. asoc. prof. Una Riekstiņa

\_\_\_\_\_

paraksts

datums

Recenzente: Linda Klimavičiusa

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātes dekanātā

Lietvede: Juta Bārtule

\_\_\_\_\_

paraksts

datums

Darba aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

2014. gada” \_\_”. \_\_\_\_\_

Protokola Nr. \_\_\_\_\_

Vērtējums \_\_\_\_\_

Komisijas sekretārs \_\_\_\_\_

Zinātniskais grāds, vārds, uzvārds

paraksts

datums