

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

Medicīnas fakultāte

**Augu bioloģiski aktīvo vielu darbības molekulāro
mehānismu pētījumi**

Kristīne Saleniece

Promocijas darbs

Rīga

2010. gads



**LATVIJAS
UNIVERSITĀTE**
ANNO 1919

**Projekts „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē”
Vienošanās Nr. 2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/00**

Promocijas darbs izstrādāts ar ESF projekta „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” Nr.2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/00 atbalstu Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē sadarbībā ar Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Hromatogrāfijas laboratoriju un Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratoriju (vad. Dr.farm., LZA korespondētājlocekle M. Dambrova).

Promocijas darba vadītāji: prof., Dr.hab.biol. Ruta Muceniece
Latvijas Universitātes
Medicīnas fakultāte
LZA īstenā locekle

Dr.ķīm. Gunārs Tirzītis
Valsts emeritētais zinātnieks
Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Promocijas padomes priekšsēdētāja: Dr.habil.med. A. Žilēviča

Recenzenti:

Aizstāvēšana notiks 2010.gada.....
Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas nozaru
promocijas padomes sēdē Rīgā, Latvijas Universitātesaulā, Raiņa
bulv. 19.

ANOTĀCIJA

Promocijas darbs ir veltīts augu triterpēnu: betulīna, betulīnskābes, lupeola un pārtikas produkta – kartupeļu CNS efektu izpētei, kā arī glikoalkaloīdu un polifenolu satura noteikšanai kartupeļos. Bioaktīvo vielu daudzuma noteikšanai augos un izolēto bioloģiski aktīvo dabas vielu darbības molekulāro mehānismu noskaidrošanai ir mērķis – izvērtēt dabas vielu iespējamo pielietojumu medicīnā. Daži no šiem savienojumiem jau tiek izvērtēti klīniskajos pētījumos. Piemēram, betulīns ir bērzu tās galvenais triterpēns, bet tā atvasinājums betulīnskābe un betulīnskābes sintētiskie analogi klīnikā tiek pārbaudīti melanomas un HIV ārstēšanai.

Promocijas darba rezultātā ir iegūti dati par pētīto dabas vielu darbības mehānismiem. Atklāts, ka betulīns selektīvi saistās pie melanokortīnu receptoru pirmā apakštipa, kura aktivācija ir saistīta ar ādas pigmentāciju un melanomu, un antagonizē α -MSH peptīda izraisīto cAMF stimulāciju. Betulīns saistās arī ar smadzeņu darbību bremsējošā mediatora γ -aminosviestskābes (GASS) A tipa receptoru $GASS_A$. Betulīnskābe un lupeols nesaistās ne ar melanokortīnu, ne ar $GASS_A$ receptoriem.

Kartupeļos novērots mainīgs benzodiazepīnu (diazepama) saturs un pirmo reizi pierādīts, ka kartupeļiem, pateicoties tajos atrastajai GASS vai GASS-erģiskām vielām, piemīt CNS efekti.

Divas sezonas monitorēts glikoalkaloīdu α -solanīna un α -hakonīna līmenis Latvijā audzētos kartupeļos un pierādīts, ka to saturs kartupeļos ir ļoti zems.

Noteikts polifenolu saturs kartupeļu sulā, kas, izteikts galluskābes ekvivalentos, ir apmēram zaļās un melnās tējas polifenolu līmenī: apmēram 0.95 mg/ml kartupeļu sulas.

Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, varam secināt, ka augu bioloģiski aktīvo vielu darbības molekulārie mehānismi ir daudzveidīgi un vielu ķīmiskajai uzbūvei ir ļoti liela nozīme, jo no strukturāli līdzīgajiem triterpenoīdiem tikai betulīns uzrādīja CNS ietekmējošu darbību. Betulīna saistīšanās ar melanokortīnu receptoriem varētu būt betulīna pretiekaisuma un ādas balinošā efekta darbības mehānisma pamatā, bet saistīšanās pie $GASS_A$ receptoriem izskaidro betulīna pretkrampju efektus. Betulīna farmakoloģisko efektu atšķirība no ķīmiski radniecīgajiem savienojumiem betulīnskābes un lupeola liecina par iespēju betulīna molekulu izmantot jaunu bioloģiski aktīvu vielu sintēzei.

Pirmo reizi parādīts, ka kartupeļus var uzskatīt par funkcionālu pārtikas produktu, kas ietekmē smadzeņu darbību. Šāds secinājums izdarīts, jo līdz šim nebija publicētu datu par kartupeļu ietekmi uz CNS pēc perorālas ievadīšanas. Atsevišķām vielām, kuras atrastas kartupeļos - benzodiazepīniem, GASS, polifenoliem, glikoalkaloīdiem - dažādā koncentrāciju diapazonā ir pierādīta bioloģiska darbība *in vivo*, bet mēs pirmo reizi parādījām kartupeļu sulas pretkrampju darbību pelēm un izskaidrojām šo efektu ar kartupeļu aktīvo vielu saistīšanos ar GASS_A receptoriem. Pierādījām, ka aktīvās vielas, kas saistās ar GASS_A receptoru, ir diazepams un GASS.

Atslēgvārdi: betulīns, betulīnskābe, polifenoli, antioksidanti, benzodiazepīni, GASS, glikoalkaloīdi, radioligandu saistīšanās, AEŠH metode.

ABSTRACT

This doctoral thesis is devoted to studies of the CNS effects of the plant triterpenes betulin, betulinic acid and lupeol, as well as those of potatoes. Determination of the level of bioactive compounds in plants and molecular mechanisms of action of isolated biologically active substances is consistent with the far-reaching goal of evaluating applicability of biologically active plant substances in medicine. Some of these compounds have already been investigated in clinical settings, where the anti-melanoma and anti-HIV properties of betulin and betulinic acid have been demonstrated. Clinical studies have revealed that betulin selectively binds to the first subtype of the melanocortin receptor, whose activation regulates skin pigmentation and melanoma prevention. Betulin also antagonizes α -MSH induced augmentation of cAMP production in cells. In addition, betulin binds to A type receptors of the brain neuromediator γ -amino butyric acid (GABA_A).

Our studies revealed variable concentrations of benzodiazepines (diazepam) in potato tubers, with a novel demonstration that potato juice can initiate CNS effects due to elevated content of GABA or GABA-ergic compounds in the potato. We monitored levels of glycoalkaloids in potato varieties grown in Latvia and demonstrated that content of the glycoalkaloids α -solanin and α -chakonine is low. The level of polyphenols in potatoes, calculated as equivalents of gallic acid, was similar to that found in green and black tea: 190–200mg/200 ml of potato juice.

Based on further results, we conclude that the molecular mechanisms of action of plant bioactive substances are multifaceted and emphasize the significance of their chemical structure, as only betulin showed CNS action when compared with other structurally similar plant triterpenes. The anti-inflammatory and skin whitening effect of betulin might be due to its binding to melanocortin receptors, but the anti-convulsant and anxiolytic effects may result from its binding to GABA_A receptors. Differences in betulin's pharmacological effects in comparison with betulinic acid and lupeol suggest the possible applicability of betulin in the synthesis of novel drugs.

We have demonstrated a novel finding that whole potato tubers may have the ability to directly influence physiological processes affecting health, besides serving as a

functional food. While it was previously known that benzodiazepines, GABA, polyphenols and glycoalkaloids act *in vivo*, our data demonstrating CNS effects of the potato are novel.

Keywords: betulin, betulinic acid, polyphenols, GABA, glycoalkaloid, radioligand binding, HPLC assay.

SATURS

	Lpp.
ANOTĀCIJA	3
ANOTĀCIJA angļu valodā	5
SATURS	7
SAĪSINĀJUMI	10
DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS	12
PUBLIKĀCIJU SARAKSTS	12
1. IEVADS	15
1.1. Darba mērķis un uzdevumi	16
2. LITERATŪRAS APSKATS	17
2.1. Augu sekundārie metabolīti	17
2.2. Funkcionālais uzturs	18
2.2.1. Kartupeļu farmakoloģiskie efekti	22
2.2.2. Uzturvielu sastāvs kartupeļos	24
2.3. Benzodiazepīni augos	25
2.3.1. Neuroaktīvās vielas kartupeļos	25
2.3.2. Benzodiazepīni kartupeļos	26
2.4. Polifenoli	27
2.4.1. Polifenolu biosintēze augos	27
2.4.2. Polifenolu klasifikācija	27
2.4.3. Polifenoli kā funkcionālā uztura sastāvdaļa	28
2.4.4. Polifenoli kartupeļos	30
2.5. Glikoalkaloīdi	31
2.5.1. Glikoalkaloīdu biosintēze	31
2.5.2. Glikoalkaloīdi nakteņu dzimtas augos	32
2.5.3. Glikoalkaloīdi kartupeļos	34
2.5.4. Glikoalkaloīdu saturs dažādās kartupeļu daļās	36
2.5.5. Glikoalkaloīdu līmeni ietekmējošie faktori	38
2.5.6. Glikoalkaloīdu loma augos	39
2.5.7. Glikoalkaloīdu ietekme uz šūnām, dzīvnieku un cilvēka organismu	40
2.5.7.1. Glikoalkaloīdu toksiskie efekti	40
2.5.7.2. Glikoalkaloīdu ārstnieciskie efekti	41
2.6. Gammaamīnosviestskābe (GASS) augos	43
2.7. Lupāna rindas triterpēni: betulīns, betulīnskābe, lupeols	43

3. MATERIĀLI UN METODEDES	47
3.1. Reaģenti	47
3.2. Pētāmās vielas	47
3.3. Šūnu līnijas	48
3.4. Šūnu kultūras	48
3.5. Tripsinizēšana un šūnu skaitīšana	49
3.6. Dzīvo šūnu skaita noteikšana	49
3.7. Šūnu transfektēšana	49
3.7.1. Melanokortīnu receptoru apakštipu DNS konstrukti	50
3.8. Ligandu-receptoru saistīšanās noteikšana	51
3.8.1. Melanokortīnu ligandu receptoru saistīšanās noteikšana	51
3.8.2. Ligandu saistīšanās pie benzodiazepīnu saistīšanās vietas uz GASS _A receptoriem	51
3.8.3. Ligandu saistīšanās pie GASS saistīšanās vietas uz GASS _A receptora	52
3.9. cAMF producēšanās mērījumi	52
3.10. Diazepama un GASS līmeņu noteikšana kartupeļu ekstraktos ar AEŠH metodi	53
3.11. Diazepama identifikācija ar gāzu hromatogrāfu	54
3.12. Glikoalkaloīdu līmeņu mērījumi kartupeļos ar AEŠH metodi	55
3.13. Polifenolu satura noteikšana	56
3.14. Datu apstrāde	57
4. REZULTĀTI	58
4.1. Betulīna saistīšanās pie melanokortīnu receptoriem	58
4.2. Betulīna efekti uz cAMF producēšanos šūnās	60
4.3. Betulīna saistīšanās pie GASS _A receptora benzodiazepīnu un GASS saistīšanās vietām	61
4.4. Kartupeļu sulas saistīšanās pie benzodiazepīnu un GASS saistīšanās vietām uz GASS _A receptora	63
4.5. Diazepama pierādīšana kartupeļos	65
4.6. GASS noteikšana kartupeļu sulā	67
4.7. Glikoalkaloīdu saturs kartupeļos	68
4.8. Polifenolu saturs kartupeļu šķirnēs – „Adretta”, „Herta” un „Laura”	71

5. DISKUSIJA	72
5.1. Betulīna selektīvā saistīšanās pie MK receptoru pirmā apakštipa	72
5.2. Betulīns – GASS _A receptora agonists	73
5.3. Kartupeļu bioaktīvo vielu loma kartupeļu kā funkcionālā uztura izvērtēšanā	75
5.3.1. Benzodiazepīni un GASS kartupeļos	75
5.4. Glikoalkaloīdu līmenis Latvijā audzētos kartupeļos	78
5.5. Polifenolu līmenis kartupeļos	81
6. SECINĀJUMI	83
7. PATEICĪBAS	85
8. LITERATŪRA	86

SAĪSINĀJUMI

AchE	acetilholīnesterāze
AEŠH	augstefektīva šķidrums hromatogrāfija
AF	apgrieztā fāze
ANOVA	one-way analysis of variance
AP – 1	aktivatora proteīns 1 (transkripcijas faktors)
α -MSH	α -melanocītstimulējošais hormons
Bzd	benzodiazepīns
cDNS	cikliskā dezoksiribonukleīnskābe
CME	cietfāzes mikroekstrakcija
CNS	centrālā nervu sistēma
CYP450	citohroma 450 kompleksa enzīms
cAMF	cikliskais adenozinmonofosfāts
DE	diazepāma ekvivalents
ΔD	vidējais optiskais blīvums
Δc	vidējā koncentrācija
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
FBS	liellopu embrija serums
FUFOSE	Funkcionālā uztura zinātne Eiropā
GASS	γ -aminosviestskābe
GASS _A	γ -aminosviestskābes A tipa receptors
GSE	galluskābes ekvivalents
HIV	cilvēka imūndeficīta vīruss
IBMX	izobutilmetilksantīns
IFIC	Starptautiskā pārtikas informācijas padome
IBMX	3-izobutil-1-metilksantīns
IC ₅₀	inhibējošā koncentrācija 50% apmērā
IFIC	Starptautiska Pārtikas Informācijas Padome (<i>The International Food Information Council</i>)
IL-10	interleikīns 10
i.p.	intraperitoneāli
K _i	inhibīcijas konstante

LGG	<i>Lactobacillus GG</i>
LPS	baktēriju lipopolisaharīdi
MEM	šūnu barotne (minimal essential medium)
MK	melanokortīni
MKR	melanokortīnu receptori
MS	masspektrometrs
NDP-MSH	peptīds, α -MSH analogs
NF – κ B	nekrotiskais faktors kapa B
PBS	Buferšķīdums
pCMV/neo	vektors
PKA	proteīnkināze A
pM	pikomols
PPARs	transkripcijas faktors
PVO	Pasaules Veselības organizācija
RNS	ribonukleīnskābe
Rs	savstarpējā izšķiršana
SPE	solid phase microextraction
SREBPs	transkripcijas faktors
U/ml	darbības vienības/mililitrā

DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, tā apjoms ir 104 lappuses. Darbs satur 10 tabulas un 21 attēlu. Literatūras sarakstā ir 174 literatūras avoti.

Zinātniskā darba aprobācija notikusi 5 konferencēs un kongresos.

Promocijas darba rezultāti apkopoti 3 starptautiski citējamās žurnālos.

PUBLIKĀCIJU UN ZIŅOJUMU SARAKSTS

Publikāciju saraksts

Promocijas darbs ir veidots kā publicēto rakstu kopa un promocijas darbā iekļauti arī vēl nepublicēti dati.

I. Muceniece R., **Saleniece Kr.**, Riekstina U., Krigere L., Tirzitis G., Ancans J. Betulin binds to melanocortin receptors and antagonizes alpha-melanocyte stimulating hormone induced cAMP generation in mouse melanoma cells. *Cell Biochem Funct.* 2007;25: 591-596.

II. Muceniece R., **Saleniece Kr.**, Krigere L., Rumaks J., Dzirkale Z., Mezhapuke R., Kviesis J., Mekss P., Klusa V., Schioth H.B., Dambrova M.
Potato (*Solanum tuberosum*) juice exerts an anticonvulsant effect in mice through binding to GABA receptors. *Planta Med.* 2008;74(5):491-496.

III. Muceniece R., **Saleniece Kr.**, Rumaks J., Krigere L., Dzirkale Z., Mezhapuke R., Zharkova O., Klusa V. Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90:712-716.

Par rezultātiem ir ziņots zinātniskajās konferencēs un kongresos:

1. Krigere L., **Saleniece K.**, Muceniece R., Dambrova M., Tirzitis G. The betulin binding to the GABA and benzodiazepine receptors in the mice brain. The IX International Congress „Actual problems of creation of new medicinal preparations of natural origin”, *Phytopharm* 2005, St. Peterburg, June 22-25, 2005, 805p.

2. Vrublevska Kr., Petjkane I., Krigere L., **Saleniece Kr.**, Muceniece R. Experience of the dispensing of plant and sea animal extract-based rheumatoid arthritis drugs. Abstracts 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences (Tartu, 13 – 15 September 2007), Eur J Pharm Sci, 2007, 32/1S, S33.
3. **Kr.Saleniece**, I.Korcagina, L. Krigere, Kr.Vrublevska, R. Muceniece. Studies on extemporal drug storage and expiration dates. Abstracts 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences (Tartu, 13 – 15 September 2007) Eur J Pharm Sci , 2007, 32/1S suppl., S24-S25.
4. Krigere L., Jekabsons Kr., **Saleniece Kr.**, Muceniece R. Qualitative and quantitative analysis of the phenazepam tablets 12 years after manufacturing. Abstracts 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences (Tartu, 13 – 15 September 2007) Eur J Pharm Sci, 2007, 32/1S suppl., S24.
5. **K. Saleniece**, S. Bērziņa, G. Tirzītis. Antiradical properties and ability to reduce ferric ions in St. Johns wort and strawberry leaves. International conference "Pharmacology in Latvia: stepping into the 21st century", March 12-13, 2004, Rīga, Proc.Latvian Acad.Sci., Section B, 58, 2004, A10.

Dalība projektos:

- 1) LU pētniecības projektā: Kartupeļu (*Solanum tuberosum, L.*) ekstrakta ārstniecisko īpašību zinātniskā izpēte" (vadītāja prof. R.Muceniece).
- 2) LZP projektā: Melanokortīnu un to sintētisko mimētiķu loma neuro-immūno-endokrīno sistēmu savstarpējā mijiedarbībā (2005-2008).
- 3) LZP projektā Nr. 09.1037: "Neuropeptīdu, augšanas faktoru un hemokīnu ietekme uz šūnu migrāciju, diferenciaciju un funkcionalitāti in vitro"(2009-2011).

Promocijas darba laikā ir bijusi sadarbība ar pētniekiem citos projektos. Šīs sadarbības laikā publicēti raksti:

I. Krīgere L., Saleniece Kr., Rumaks J., Muceniece R.. Binding of a substance P antagonist, spantide I, to melanocortin receptors. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2003; V57:158-164.

II. Krīgere L., Liepinsh E., Kirjanova O., Saleniece Kr., Korotejeva O., Zvejniece L., Dambrova M., Muceniece R.. Binding peculiarities of a melanocyte stimulating hormone and its analogue [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH to melanocortin receptor subtype 1 on mouse melanoma B16-F1 cells. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2003; V57:164-168.

III. Štāmere B., Krīgere L., Saleniece K., Vikmanis U., Muceniece R. Studies on the interaction between the opioid and melanocortin-ergic systems: dynorphin binding to melanocortin receptors. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2004; V58:9-14.

IV. Krīgere L., Saleniece Kr., Zvejniece L., Liepiņš E., Vilšķērsts R., Dambrova M., Muceniece R. Melanokortīnu receptora 1.apakštipa ekspresijas regulācija makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7. *Latvijas Universitātes raksti*, 2006; Nr.694: 60-67.

V. Muceniece R., Riekstiņa U., Vrublevska Kr., Krīgere L., Saleniece Kr., Čakstiņa I., Ancans J. Primary human fibroblastic cells *in vitro* loose ability to express cell surface melanocortin receptor. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2007;61, Nr.6, 201-206.

1. IEVADS

Pēdējās desmitgadēs jaunu ārstniecības vielu izstrādē un profilaktisko līdzekļu meklējumos liela uzmanība tiek pievērsta augu bioaktīvajām vielām. Samērā bieži jauni zāļu prototipi ir atrasti, ņemot vērā un kritiski izvērtējot tautas medicīnas atziņas. Mūsdienās empīrisko zināšanu izvērtēšanai ir pieejamas modernas metodes. Tas ir ļāvis noskaidrot daudzu dabas vielu darbības mehānismus molekulārā līmenī. Savukārt cilvēka genoma atšifrēšana ir veicinājusi kompleksu daudzfaktoru slimību izpēti. Pēc bioķīmisko marķieru salīdzināšanas izrādījās, ka daudzas saslimšanas un to riska faktori ir cieši saistīti, piemēram, neuroiekaisums, aptaukošanās, kardiovaskulārās slimības un vēzis. Tāpēc dabas vielu darbības molekulāro mehānismu noskaidrošana un farmakoloģiskās darbības novērtēšana arvien plašāk iegūst praktisku pielietojumu klīnikā. Gan izolētas aktīvās vielas, gan viss augs kompleksi iedarbojas uz šūnu signālceļiem, kurus var gan stimulēt, gan nomākt dabas vai sintētisko vielu lietošanas rezultātā. Svarīgi ir pārliecināties par vielu ietekmi uz organismam svarīgiem procesiem. Piemēram, daudzas izolētās augu aktīvās vielas ir lipofīlas molekulas, kas pāriet asinsvadu-smadzeņu barjeru un iedarbojas uz smadzeņu receptoriem, izraisot centrālās nervu sistēmas (CNS) efektus.

Mūsdienās tiek pētīta arī funkcionālā uztura loma veselības saglabāšanā. Funkcionālais uzturs tiek definēts kā parastas diētas daļa, kas satur bioloģiski aktīvas vielas ar pierādītu ietekmi uz kādas slimības riska faktoriem.

Bez proteīnu, ogļhidrātu un lipīdu sintēzes augos notiek dažādi bioķīmiski procesi, kuru rezultātā rodas bioloģiski ļoti aktīvi savienojumi – sekundārie metabolīti. Sekundārie metabolīti bieži ir izmantoti kā prototipi jaunu ārstniecības līdzekļu radīšanai, jo ir atklāts, ka augos sintezētās vielas, nokļuvušas cilvēka organismā, atrod bioķīmiskos šūnu tiecāmelementus (*targets*) un var darboties līdzīgi hormoniem vai neiromediatoriem.

Darba tēma atbilst agrāk izvirzītajām LR zinātnes prioritātēm 2006-2010. gadam „Biomedicīna un farmācija”, kā arī LZP priekšlikumiem zinātnes prioritārajiem virzieniem 2010. – 2013. gadiem „Jauni ārstniecības, diagnostikas līdzekļi un biomedicīnas tehnoloģijas”, arī LU pētniecības projektiem par tēmu „Daba un veselība”. Eksperimentālais darbs daļēji veikts LU pētniecības projekta „Kartupeļu

(*Solanum tuberosum*, L.) ekstrakta ārstniecisko īpašību zinātniskā izpēte” ietvaros un ietver vēl nepublicētos datus par glikoalkaloīdu daudzuma kartupeļos mērījumiem ar augstefektīvo šķidrums hromatogrāfijas metodi (AEŠH).

1.1. Darba mērķis un uzdevumi

Pētījuma mērķis: Pētīt augu bioloģiski aktīvo vielu darbības molekulāros mehānismus.

Uzdevumi:

- 1) noskaidrot bērzu tās aktīvo vielu betulīna, betulīnskābes un lupeola spēju saistīties ar cilvēku melanokortīnu receptoriem un ietekmēt šūnu sekundārās signālmolekulas cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMF) producēšanos;
- 2) pētīt triterpēnu betulīna, betulīnskābes un lupeola saistīšanos ar peļu smadzeņu neiromediatora γ -aminosviestskābes (GASS) A tipa receptoru ($GASS_A$);
- 3) pētīt kartupeļu ekstraktu CNS efektus: piesaistīšanos pie $GASS_A$ receptora benzodiazepīnu (Bzd) un GASS saistīšanas vietām;
- 4) ar augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas (AEŠH) metodi izmērīt kartupeļu glikoalkaloīdu, benzodiazepīnu un GASS saturu vairāku šķirņu kartupeļos;
- 5) mērīt polifenolu saturu kartupeļos un salīdzināt to vairākām kartupeļu šķirnēm.

Darbs tika veikts doktorantūras un pēcdoktorantūras studiju laikā LU Medicīnas fakultātē.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Augu sekundārie metabolīti

Augi satur tūkstošiem vielu, kas sintezējas un metabolizējas dažādu faktoru tiešā vai netiešā ietekmē. Pie augu sekundārajiem metabolītiem pieskaita vairāk kā 30000 dažādas ķīmiskās struktūras vielas, kuras sintezējas ļoti mazos daudzumos un nav oglehidrāti, proteīni, tauki, minerālvielas un vitamīni. Visplašāk pētīti ir tie sekundārie metabolīti, kuriem atklāta farmakoloģiska darbība – imūnās sistēmas stimulācija, antioksidantu efekti vai patogēnu mikroorganismu nogalināšanas spēja. Piemēri minēti 1.tabulā.

Tabula 1. Sekundārie metabolīti augos

Viela	Avoti	Efekti
Karotinoīdi	Organiskie pigmenti augļos, dārzeņos, galvenokārt sarkanā, dzeltenā, oranžā krāsā	Antioksidanti, pretvēža darbība, imunostimulatori, infarkta profilakses līdzekļi
Fitosteroli	Saulespuķu, sezama sēklas, sojas pupas	Pazemina holesterīna līmeni
Saponīni	Spināti, pupas	Pazemina holesterīna līmeni, stimulē imūno sistēmu, profilaktiski pasargā no zarnu vēža
Glikolizanāti	Sinepes, mārrutki, redīsi, kreses, ķirbji	Profilaktiski pasargā no infekcijām un vēža
Flavonoīdi	Organiskie pigmenti sarkanā, violetā, zilā krāsā	Antioksidanti, antibakteriāla, pretvīrusu, pretiekaisuma, pretaudzēju darbība
Proteāžu inhibitori	Kvieši, pupas, kartupeļi	Regulē cukura līmeni, pretvēža darbība
Terpēni	Augu aromātiskās vielas, ēteriskās eļļas, garšaugi	Samazina risku saslimt ar vēzi, palielina gremošanas fermentu izdali
Fitoestrogēni	Kvieši, pākšaugi, sojas pupas	Līdzīgi hormoniem, pretvēža efekti
Sēru saturošie savienojumi	Sīpoli, ķiploki, citi liliju dzimtas augi	Antibakteriāli, samazina holesterīna līmeni, antioksidanti, pretvēža darbība
Fitīnskābe	Kvieši, pākšaugi, lini	Antioksidanti

Lielākajai daļai sekundāro metabolītu piemīt antioksidantu un vairāk vai mazāk izteiktas pretaudzēju īpašības. Diemžēl, pārtikā lietotajiem augu antioksidantiem ir ļoti zema biopieejamība, tāpēc *in vivo* to tiešie antioksidatīvie efekti vairumā gadījumu nav pierādīti. Pētot iemeslus, kāpēc augiem ir pretvēža un imūnās sistēmas stimulācijas darbība *in vivo*, pētnieki secinājuši, ka augu bioaktīvajām vielām ir lielāka ietekme uz gēnu ekspresiju šūnās kā sākotnēji tika domāts. Atklāta dažādu bioaktīvo vielu ietekme uz dažādu transkripcijas faktoru aktivāciju: AP-1, NF-κB, SREBPs, PPARs u.c (Polya, 2003). Šie novērojumi parāda tālāku nepieciešamību pētīt augu bioaktīvo vielu darbības detalizētus molekulāros mehānismus, lai noskaidrotu un izskaidrotu augu aktīvo vielu lomu daudzu slimību – aptaukošanās, aterosklerozes, hipertensijas un vēža profilaksē (Heinrich et al., 2004; Pateraki and Kanellis, 2010; Chatterjee et al., 2010).

2.2. Funkcionālais uzturs

Jēdziens „funkcionālais uzturs” tika ieviests Japānā 1980.os gados, kad veselības sistēmas autoritātes secināja, ka veselības aprūpes finansējums ir jākontrolē, un jo īpaši sabiedrībā ar lielu vecu cilvēku skaitu diēta nosaka dzīves kvalitāti un novērš riska faktorus saslimt ar plaši izplatītām slimībām, tai skaitā cukura diabētu, sirds slimībām, vēzi. Tomēr pašu ideju ir izteicis jau Hipokrāts rakstīdams, ka pārtika ir zāles, un šis princips gadsimtiem ilgi ir bijis Ķīnas, Japānas un Korejas medicīnas vadmotīvs (Anonīms, 1998; Anonīms, 1999; Anonīms, 2000).

Mūsdienās funkcionālais uzturs definēts kā parastas diētas daļa, kas satur bioloģiski aktīvas vielas ar pierādītu ietekmi uz kādas slimības riska faktoriem (Anonymous, 1999a; Ashwell, 2001; Bidlack and Wang, 1999). Funkcionālā uztura piemēri ir pārtikas produkti ar specifisku minerālu, vitamīnu, taukskābju, baktēriju, šķiedrvielu un fitoķīmisko vielu sastāvu. Apzināšanās, ka ar uzturvielām var palīdzēt atgūt vai saglabāt veselību, ir notikusi pakāpeniski. Vispirms tika atbalstīta augļu, veselu graudu un dārzeņu lietošana pārtikā, tad sekoja uztura bagātinātāju kā farmaceitisko firmu produktu ieviešana (Milner, 1999; Pariza, 1999; Edens, 1999). Kā funkcionālais uzturs var kalpot dabīgs produkts, produkti ar piedevām, piemēram, pēc

dabīgo antioksidantu, fitoestrogēnu, baktēriju, vitamīnu u.c. vielu pievienošanas, un produkti ar kādas sastāvdaļas modifikācijām. Funkcionālais uzturs ir kādas lielas cilvēku grupas patēriņa prece (Anonymous, 2002; Anonymous, 2002a).

Lai koordinētu pētījumus un ieviestu vienotu funkcionālā uztura koncepciju, Eiropā ir nodibināta organizācija FUFOSSE (*Functional Food Science in Europe*), kas savā programmā atbalsta uzturvielu pētījumus 6 virzienos (Dwyer, 1999; Blenford, 1995; Caragay, 1992; Childs, 1994):

- 1) šūnu un organismu augšana, attīstība un diferenciacija;
- 2) substrātu metabolisms;
- 3) aizsardzība pret brīvajiem radikāļiem;
- 4) funkcionālais uzturs, kas pasargā kardiovaskulāro sistēmu;
- 5) gastrointestinālā fizioloģija;
- 6) uztura ietekme uz psihi un uzvedību.

Funkcionālajam uzturam ir divu veidu aktivitātes: spēja paaugstināt fizioloģisku funkciju, kas nav saistīta ar slimību un spēja samazināt saslimšanas risku (Dai and Luo, 1996). Piemēram, specifiski oligosaharīdi uzlabo baktēriju mikrofloru kuņģa-zarnu traktā, produkta sastāvā esošais kofeīns dod mundrumu. Ar kalciju bagāti produkti novērš risku saslimt ar osteoporozi un tāpēc ar kalciju tiek bagātināts piens, jogurts un sulas.

Funkcionālā uztura programma piedāvā jaunas pētniecības projektu iespējas, piemēram, noteikt kādā reģionā plaši lietotu pārtikas produktu sastāvu un izvērtēt atsevišķu komponentu ietekmi uz cilvēku veselību, ieskaitot alerģiskas reakcijas (Dai and Luo, 1996; De Felice, 1995; Goldberg, 1994).

Funkcionālā uztura aktīvās vielas var ietekmēt: ar vecumu saistītas izmaiņas gan šūnu, gan vesela organisma līmenī, hormonu - atkarīgo vēža tipu veidošanos, svara un tauku nogulsnešanās izmaiņas un smadzeņu darbību (Hunt, 1994; Huggett, 1996; Anonymous, 1995).

Īpaši populāras bioaktīvas pārtikas sastāvdaļas vai augu ekstrakti tiek pētīti plašāk, lai noteiktu, kā tie ietekmē kardiovaskulāros, neirodeģeneratīvos un kancerogēnos procesus. Tādā griezumā ir pētīti žeņšeņs, ginks, rieksti, graudi, tomāti, sojas fitoestrogēni, kurkumīns, melatonīns, polifenoli, vitamīni, karnitīns, karnozīns, ubikvivoni, utt. (Frusciante et al., 2000; Anonymous, 2003; Sloan, 2002; Cohen et al.,

2003). Bioaktīvo vielu aizsargājošā darbība reizēm tiek vērtēta pēc antioksidatīvās, mitohondriju stabilizējošās aktivitātes, metālu helātu veidošanās, dzīvo šūnu apoptozes inhibīcijas un vēža šūnu apoptozes ierosināšanas. Īpaši daudz datu ir publicēts par sojas, linsēklu un sarkanā āboliņa fitoestrogēnu (izoflavonu) kardioprotektīvo darbību, spēju aizkavēt osteoporozi un samazināt risku saslimt ar krūts, priekšdziedzera vēzi, kā arī spēju samazināt menopauzes simptomus. Bez tam sojas proteīniem pierādīta labvēlīga ietekme uz kognitīvām funkcijām (Messina and Messina, 2003; Cohen et al., 2003).

Pēc definīcijas funkcionālais uzturs ir parastas diētas daļa, kas satur bioloģiski aktīvas vielas ar pierādītu ietekmi uz kādas slimības riska faktoriem (Anonymous, 1999a). Tomēr zinātniskajā literatūrā reizēm trūkst pierādījumu par visa produkta bioloģisko efektu un, ja produkts satur kādu ingredientu, kam ir pētīta ietekme uz kādas slimības riska faktoriem, tad pārtikas produktam piedēvē aktīvā ingredienta īpašības (Okura et al., 2010; Hirai et al., 2010; Rodriguez et al., 2010). Piemēram, genisteīns ir sojas izoflavonoīds ar spēju samazināt risku saslimt ar krūts vēzi, bet likopēns ir A vitamīnam līdzīga viela, kas atrasta tomātos, meklējot cēloni, kāpēc tomāti samazina risku saslimt ar priekšdziedzera vēzi un sirds slimībām. Katehīni ir zaļās tējas bioaktīvās vielas, kas arī samazina risku saslimt ar vēzi un sirds slimībām (Messina and Messina, 2003; Frusciante et al., 2000). Mūsdienās par funkcionālu uzturu uzskata gan augu, gan dzīvnieku, kā arī biotehnoloģiskā ceļā radītus pārtikas produktus. Līdzīgi kā zāļvielas (*pharmaceuticals*) ir ieviests termins uzturvielas ar ārstniecisku efektu (*nutraceuticals*) (Goldberg, 1994). Lai unificētu dažādos viedokļus par funkcionālo uzturu jeb funkcionālo pārtiku, 1985. gadā tika nodibināta Starptautiska Pārtikas Informācijas Padome (*The International Food Information Council* (IFIC)) (Anonymous, 2002). IFIC veiktā patērētāju aptauja liecināja, ka cilvēki labprātāk pieņem terminu funkcionālais uzturs nekā piedāvātos jaunus nosaukumus: dizainētais uzturs, farmapārtika, fitoķimikālijas, utt. Patērētāji izteikuši bažas, vai modificētā uzturā tiek kontrolēts bioaktīvo komponentu daudzums, lai pārtikas produkts nepārvērstos par medikamentu.

Pirmās paaudzes funkcionālais uzturs bija ar vitamīniem, kalciju un šķiedrvielām bagātināti produkti. Šo produktu epidemioloģiskos pētījumus veica, ņemot vērā attiecīgo komponentu ietekmi uz organisma funkcijām. Otrās paaudzes funkcionālais uzturs bija dabīgie produkti, kā zaļā tēja, brokoļi, tomāti, jogurti, un

pētījumi tika veikti, nosakot komponentos nesadalīta produkta efektivitāti. Trešās paaudzes funkcionālā uztura piemēri ir jaunu ingredientu ieviešana un uztura pētījumu veikšana līdzīgi kā zālvielām, sākot ar skrīningu, vadošās vielas bioaktivitātes noteikšanu un tās biopieejamības pētījumiem (Anonymous, 2002a).

Viena no funkcionālā uztura pētījumu sfērām ir tā ietekme uz fizioloģiskām organisma funkcijām, piemēram, kuņģa - zarnu trakta darbību. Ir zināms, ka miljoniem baktēriju nosaka gremošanas trakta floru. Ir aprēķināts, ka šo baktēriju masa ir lielāka par 1 kg un to veido vairāk kā 400 dažādu baktēriju celmu. Līdzsvars starp tām nosaka cilvēku labsajūtu un veselību. Savukārt baktēriju līdzsvaru nosaka vairāki mainīgi faktori, kā zāļu lietošana, slimības, stress, vecums un saindēšanās (Roberfroid, 1998; Sands, 1999; Bouhnik et al., 1999). Prebiotiskās baktērijas darbojas, veicinot vajadzīgo baktēriju vairošanos zarnās. Prebiotiskie produkti ietver arī citus ingredientus, kā, piemēram, saliktos oligosaharīdus (inulīnu), kas tiek pievienoti dažiem jogurtiem.

Funkcionālo uzturu pēc lietošanas drošības apsvērumiem iedala trīs grupās:

1. uzturs vai tā sastāvdaļas, kas ir ekvivalentas tradicionāli lietotai pārtikai;
2. uzturs vai tā sastāvdaļas, kas ir ļoti tuvas tradicionālajiem produktiem;
3. uzturs vai tā sastāvdaļas, kas atšķiras no tradicionālā produkta.

Tradicionālai diētai lietošanas drošība ir veidojusies gadsimtiem ilgas pieredzes uzkrāšanas ceļā. Pie kam uzskati par diētu un tās ietekmi uz veselību dažādās valstīs atšķiras (Dai and Luo, 1996). Funkcionālā uztura mākslīga veidošana rada produktu, kas ir uz robežas starp pārtiku un zālēm. Tieši šiem jaunajiem produktiem ir jābūt izstrādātai kontroles sistēmai (Anonymous, 2003; Fruciante et al., 2000; Huggett, 1996).

Par funkcionālo uzturu var uzskatīt produktus, kas satur makroelementus, kuriem piemīt specifisks fizioloģisks efekts (rezistentā ciete, nepiesātinātās omega-3 taukskābes) vai arī svarīgus mikroelementus; tie var būt pārtikas produkti, kuru sastāvā ir komponenti ar nelielu uzturvērtību (specifiski oligosaharīdi) vai komponenti bez uzturvērtības (mikroorganismi vai augu fitoķīmiskās vielas).

To, ka funkcionālais uzturs arvien vairāk ienāks mūsu ēdienkartē, nosaka vairāki apstākļi: zinātniskie pētījumi, kas parāda diētas lomu veselības saglabāšanā un

uztura kvalitātes izmaiņas. Tomēr funkcionālais uzturs neaizstāj veselīgu, sabalansētu diētu un aktīvu dzīvesveidu.

2.2.1. Kartupeļu farmakoloģiskie efekti

Kartupeļi ir nozīmīga bioloģiska kultūra un ir viens no 20 mūsdienu pārtikas pamatproduktiem. Kartupeļi tiek uzskatīti par vienu no pārtikas “gigantiem” pasaulē, jo pēc uzturā lietotā daudzuma tie ieņem ceturto vietu aiz rīsiem, kviešiem un kukurūzas. Diemžēl kartupeļu farmakoloģiskos efektus sāka pētīt tikai pēdējos gados, pie kam vairāk pētījumu un zinātnisku publikāciju ir par kartupeļu glikoalkaloīdu toksicitāti un par to, vai cepti kartupeļi nesatur kancerogēnas vielas.

Lai pārtikas produkts iegūtu statusu „funkcionālā pārtika” jeb „funkcionālais uzturs” (tie ir sinonīmi), sākotnēji ir jābūt precīzi zināmam ķīmiskajam sastāvam. Tikai tad, kad ir zināmi produktā esošie savienojumi, var veikt to zinātnisko izpēti, noskaidrojot iedarbību uz organismu.

Kartupeļi ir visizplatītākais nakteņu dzimtas kultūraugs, kura izcelsme meklējama Dienvidamerikā Andu kalnu reģionā. Uzskata, ka kartupeļus kultivējuši šajā reģionā dzīvojošie indiāņi apmēram 5000 gadus pirms mūsu ēras. Eiropā tie tika ievesti 1570. gadā, kad no Andu kalniem spāņi atveda vienas botāniskās sugas – *Solanum tuberosum*, L. – kartupeļus. Kartupeļi kā pārtikas produkts savu popularitāti ieguva tikai 17. gadsimtā, jo līdz tam kartupeļus, tāpat kā citus nakteņu dzimtas augus, uzskatīja par toksiskiem (Andre et al., 2007).

Šobrīd *Solanum tuberosum*, L. ir galvenā kultūrsuga ar lielu praktisku nozīmi, kas ir ļoti izplatīta mērenā klimata joslā, it īpaši Eiropā. Šī kartupeļu botāniskā suga tika ģenētiski paplašināta un veidoti *Solanum tuberosum*, L. varianti. Kartupeļu selekcija ir virzīta, lai iegūtu gan pret slimībām izturīgus, karstuma un aukstumizturīgus, gan arī ar bioloģiski aktīvām vielām bagātākus kartupeļus (Andre et al., 2007). Kartupeļi ir arī ģenētiski modificēti (Arvanitoyannis et al., 2008; Domingo, 2007) un par to lietošanas drošību - līdzīgi kā par citiem produktiem - notiek diskusijas (Domingo, 2007).

Mūsdienās kartupeļus izmanto ne tikai kā pārtikas produktus, bet arī tautsaimniecībā cietes un spirta iegūšanai. Tieši šādiem nolūkiem izmanto ģenētiski modificētus kartupeļus. Kartupeļus izmanto arī kā ēdamu “vakcīnu” modeļus pret A un B hepatītiem. Kartupeļus “ieprogrammē” producēt imūnglobulīnus, cilvēku audzēju

nekrozes faktoru u.c., lai reizē ar ēdienu varētu stiprināt imūno sistēmu (Andre et al., 2007). 2003. gadā no kartupeļiem izolēja 45 kDa proteīnu patatīnu ar antioksidantu aktivitāti. Ar elektronu paramagnētisko rezonanses metodi nosakot brīvo radikāļu līmeni, šī proteīna antioksidanta spēju izsaka inhibējošā koncentrācija $IC_{50} = 0,775$ mg/ml (Liu et al., 2003). Patatīns ir ūdenī šķīstošs proteīns un sastāda apmēram 40% no kartupeļu proteīniem. Tam ir lipīdu fosfolipāzes aktivitāte. Patatīna gēns ir ļoti labi raksturots, jo tiek izmantots ģenētiskām modifikācijām ēdamo vakcīnu pētījumos. Patatīna gēna struktūrā ieliek vēlāmā proteīna DNS, un tālāk kartupeļi producē šo jauno proteīnu. Jāatzīmē, ka saskarsmē ar termiski neapstrādātiem kartupeļiem dažiem cilvēkiem veidojas alerģija. Tas notiek tieši patatīna alergēna spējas dēļ. Vārot kartupeļus, patatīna alergēna īpašības pavājinās vai pilnīgi pazūd (Liu et al., 2003). Patatīna gēna modifikācijas izmanto ģenētiski modificēto kartupeļu līniju iegūšanai. Šīs līnijas pēta to cilvēku glikoproteīnu iegūšanai, kurus varētu izmantot terapijā (Kim et al., 2008).

Kartupeļos ir atklāts mainīgs salicilskābes saturs. Salicilskābei ir pretiekaisuma un pretspāņu īpašības, bet tā kairina kuņģa gļotādu. Izrādās, ka, inficējot kartupeļus ar kādu patogēnu vai kairinošu vielu, kartupeļos paaugstinās salicilskābes saturs, kas liecina, ka salicilskābei kartupeļos ir aizsardzības faktora loma (Panina et al., 2005; Loake and Grant, 2007). Nesen ar transgēnu kartupeļu līnijas palīdzību noskaidroja, ka salicilskābes līmeņa izmaiņas saistītas ar Nb gēna medītētām aizsardzības reakcijām un salicilskābes līmenis korelē ar hipersensitīvu rezistenci pret kartupeļu vīrusu PVX (Sanchez et al., 2010).

Kartupeļi plaši tiek lietoti tautas medicīnā, kur tos iesaka kā baktericīdus, diurētiskus, pretspazmu un pretklepus līdzekļus (Vlachojuannis et al., 2010). Kartupeļu mizu tēja tiek ieteikta ļaundabīgo audzēju ārstēšanai. Savukārt, Indijā kartupeļu mizu tēju izmanto mutes dobuma skalošanai, lai mazinātu smaganu uzpampumu. Svaigu kartupeļu sulu lieto apetītes un gremošanas veicināšanai, to iesaka arī artrītu un dažādu iekaisumu ārstēšanai. Kartupeļu sula tautas medicīnā tiek lietota arī pret kuņģa čūlas sāpēm, paaugstinātu kuņģa skābumu un pret paaugstinātu asinsspiedienu. Klīnikā tika veikts pilotpētījums ar kartupeļu sulu, un divām trešdaļām dispeptiskiem pacientiem atklāja gastrointestinālo traucējumu novēršanu (Chrubasik et al., 2006). Tomēr tas nebija *placebo* kontrolētais pētījums, un klīniskie pētījumi jāturpina. Tautas medicīnā karstas vārītu kartupeļu masas kompreses tiek izmantotas reimatisku sāpju un tūskas

mazināšanai, bet svaigus, sarīvētus kartupeļus liek uz apdegumiem, ekzēmām un ādas nobrāzumiem.

Jāpasvītro, ka kartupeļu sastāvā esošās vielas var izraisīt gan pozitīvus efektus, gan negatīvi ietekmēt cilvēka veselību. Tas atkarīgs no tā, kādā veidā kartupeļi tiek uzglabāti un gatavoti (cepti, vārīti utml.). Ir veikti pētījumi par aktīvo vielu termostabilitāti un, piemēram, apstiprināts, ka benzodiazepīni un γ -aminosviestskābe (GASS) ir termostabili savienojumi ((Jumaa and Muller, 2002; Enna et al., 1977;), bet, vārot kartupeļus, patatīna alergēna īpašības pavājinās vai pilnīgi pazūd (Liu et al., 2003).

Mīnerālvielu daudzums pazeminās, vārot gabaliņos sagrieztus kartupeļus, bet saglabājas, vārot kartupeļus ar mizu. Vislielākie ir kālija zudumi (Bethke et al., 2008).

2.2.2. Uzturvielu sastāvs kartupeļos

Kartupeļu uzturvielu sastāvs ir atkarīgs no dažādiem faktoriem – šķirnes (ģenētiskie faktori), augsnes tipa, kartupeļu brieduma jeb gatavības pakāpes, pielietotās nezāļu apkarošanas metodes, kā arī no vides un apstākļiem, kādos kartupeļi tiek uzglabāti.

Kartupeļos ir identificētas dažādas vielas, kuras var iedalīt divās grupās – ūdens un tajā izšķīdušās vielas, un sausne. Kartupeļu bumbuļos sausnes daudzums svārstās no apmēram 13 līdz 37% (vidēji sastādot 25%), pārējos 75% vidēji sastāda ūdens. Kartupeļu bumbuļu sausnes lielāko daļu veido ogļhidrāti – cukuri, ciete un necietes polisaharīdi (šūnu membrānās esošās vielas). Neliela, bet nozīmīga kartupeļu cietes daļa ir rezistenta pret enzimatisku sašķelšanu kuņģī un tievajās zarnās. Tādējādi tā nonāk resnajā zarnā, kur tiek pakļauta bakteriālai fermentācijai, kā rezultātā veidojas īsu ķēžu taukskābes. Uzskata, ka rezistentajai cietei ir šķiedrvielām līdzīgs fizioloģiskais efekts – tā samazina holesterīna un triglicerīdu līmeni plazmā un samazina resnās zarnas vēža risku (Lister and Munro, 2000). Kartupeļu šķiedrvielas atšķirībā no cietes un cukuriem nav enerģijas avots, bet organismam tās ir nepieciešamas, lai sagremotu barību un attīrītu organismu. Šķiedrvielas var “atšķaidīt” pārtikā esošos daudzkaloriju komponentus, kā arī stimulēt zarnu peristaltiku, tādējādi nedaudz novēršot aizcietējumu veidošanos. Organisms šķiedrvielas pārstrādā maz, to

šķelšana galvenokārt notiek resnajā zarnā bakteriālās fermentācijas procesā, veidojot īso ķēžu taukskābes no šķiedrvielām. Svarīgākā no tām ir sviestskābe, jo, inducējot apoptozi, tā samazina kolorektālā vēža risku (Zhang et al., 2010). Nozīmīgākās kartupeļos esošās šķiedrvielas ir celuloze, hemiceluloze, pentozāni un pektīnvielas (Lister and Munro, 2000).

Bez ogļhidrātiem kartupeļu sausnes sastāvu veido arī proteīni, kas vidēji sastāda 1,5% no kartupeļu kopējās masas. Kartupeļos esošie proteīni ir nozīmīga enzīmu, šūnu membrānu un citoplazmas struktūru sastāvdaļa. No kartupeļu bumbuļu proteīniem 60 – 70% ir globulīni un 20 – 40% glutelīni, bet tajos nav atrasts albumīns.

Viena no proteīnu formām ir enzīmi, kas organismā darbojas kā biokatalizatori dažādās ķīmiskās reakcijās. Kartupeļu sastāvā ir dažādi enzīmi, kas piedalās gan anaboliskos, gan kataboliskos procesos: amilāze, tirozināze, katalāze, fosfatāze, peroksidāze, fosforilāze, polifenoloksidāze u.c. (Lister and Munro, 2000).

Kartupeļi satur ne tikai aminoskābes, kas ietilpst proteīnu sastāvā, bet arī aminoskābes, kas ir brīvā veidā, galvenokārt tās ir glutamīns un asparagīns, asparagīnskābe un glutamīnskābe, kas veido apmēram 53% no visām aminoskābēm. Vidēji kartupeļu bumbuļos minerālvielu daudzums sastāda 1,1% no visas kartupeļu masas (Lister and Munro, 2000). Kartupeļu minerālvielu daudzums mainās atkarībā no tā, kā kartupeļi ir audzēti, kādos apstākļos uzglabāti un kāda ir to gatavības pakāpe. Kartupeļi satur dažādas minerālvielas - tajos ir kālijs, fosfors, magnijs, sērs, kalcījs, hlors, dzelzs un silīcijs. Visvairāk kartupeļos ir kālijs, kas galvenokārt ir kartupeļu mizās un tieši zem tām (Bethke et al., 2008). Kartupeļi satur galvenokārt C un B grupas ūdenī šķīstošos vitamīnus un E vitamīnu, un citus organiskus savienojumus, kas veicina cilvēka organisma augšanu, attīstību, kā arī regulē vielmaiņas procesus un aizsargā to no saslimšanas (Camire et al., 2009). Kartupeļu uzglabāšana četrus mēnešus 10 C⁰ temperatūrā samazina antioksidantu līmeni, bet nesamazina E vitamīna daudzumu (Andre et al., 2009).

2.3. Benzodiazepīni augos

2.3.1. Neuroaktīvās vielas kartupeļos

Kartupeļos ir smadzeņu darbību nomācošas un uzbudinošas vielas – benzodiazepīni un zīdītāju centrālās nervu sistēmas neiromediatoru – acetilholīns,

noradrenalīns, adrenalīns, serotonīns un smadzeņu darbību stimulējošās aminoskābes glutamīns un glutamīnskābe (Lister and Munro, 2000). Katrai no šīm vielām organismā ir specifiska nozīme, piemēram, adrenalīns ietekmē sirds-asinsvadu sistēmas darbību, neiomuskulāro pārvadi; savukārt, serotonīns ir iesaistīts ķermeņa temperatūras, sajūtu uztveres regulācijā.

2.3.2. Benzodiazepīni kartupeļos

Benzodiazepīni ir smadzeņu darbību nomācošu vielu grupa ar dažādu hipnotisku, sedatīvu, anksiolītisku un skeleta muskulatūru atbrīvojošu efektu. Medicīniskajā praksē šīs grupas pārstāvji tiek pielietoti bezmiega, panisku baiļu, lēkmju un muskuļu spazmu mazināšanai (D'Hulst et al., 2009).

20. gadsimta astoņdesmitajos gados pirmo reizi tika aprakstīta benzodiazepīnu klātbūtne kartupeļu audu kultūrās *in vitro* (Wildman et al., 1988). Sākotnēji, kad benzodiazepīni tika atrasti mazās koncentrācijās cilvēku, dzīvnieku, kā arī savvaļas dzīvnieku smadzenēs, tika izvirzīta hipotēze par to endogēno izcelsmi. Lai to pierādītu, tika veikti daudzi eksperimenti, bet neizdevās pierādīt benzodiazepīnu endogēnu izcelsmi un sāka pētīt, vai tie nesintezējas augos, ko izmanto pārtikā (Sangameswaran et al., 1986). Izdevās pierādīt benzodiazepīnu sintezēšanos kartupeļos, kviešos, vērmelēs, baldriānos, mētrās, salvijā, rūtās, maura kumelītēs u.c. (Kavvadias et al., 2000). Šie atklājumi pārliecina, ka benzodiazepīni cilvēku un dzīvnieku organismos patiešām nonāk ar pārtiku.

1988. gadā kartupeļos atklāja lormetazepamu un pierādīja, ka asnošanas laikā lormetazepama koncentrācija kartupeļu asnos ir gandrīz desmit reizes augstāka nekā bumbuļu ēdamajā daļā - attiecīgi 0,4 ng/g un 0,05 ng/g (Wildman, 1988). Kviešu graudos identificēja diazepam, N-desmetildiazepam, delorazepam, delormetazepam, lormetazepam un izodiazepam, turpretim kartupeļu bumbuļos konstatēts diazepams, N-desmetildiazepams, delorazepams, lorazepams un delormetazepams (Wildman et al., 1988).

Sterili kultivētās vērmēļu un kartupeļu virszemes daļu šūnās noteica benzodiazepīnu saturu un pierādīja, ka augi tos sintezē paši. Sterili kultivēto kartupeļu augos temazepama un diazepama saturs svārstījās no 70 – 450 ng/g audu (Kavvadias et al.,

2000). Salīdzinājumā ar diazepama terapeitisko dienas devu (5-20 mg) kartupeļos esošā diazepama daudzums ir niecīgs. Nesen kartupeļu meristēmu un parenhīmas šūnās atklāja zīdītāju perifēro benzodiazepīnu receptoru (Corsi et al., 2004). Tas ir 30-36 kDa proteīns, kas nevienmērīgi izplatīts kartupeļu augā (parenhīmas šūnās) un lielā daudzumā atrodams meristēmas šūnās. Perifērais benzodiazepīna receptors ir zīdītāju mitohondriālo membrānu proteīns, kas iesaistīts dažādos metabolisma procesos – steroīdu ģenēzē, oksidatīvajā fosforilācijā un šūnu proliferācijā, kā arī stresa reakcijās, un 2005.gadā publicēti dati par perifērā benzodiazepīnu receptora gēnu polimorfisma saistību ar cilvēku T limfomu (Costa et al., 2006). Tomēr šī receptora loma augu attīstībā nav skaidra.

2.4. Polifenoli

2.4.1. Polifenolu biosintēze augos

Polifenoli ir vieni no augu sekundāriem metabolītiem, kas augos sintezējas no šikimskābes. To loma ir aizsargāt augus no fotosintētiskā stresa, aktīvajām skābekļa formām un fitofāģijas (Lambert et al., 2005; Cheynier, 2005).

Biosintēzes procesos polifenolu molekulu funkcionālās grupas bieži tiek ēsterificētas, metilētas, dimerizētas vai tālāk polimerizētas, tādējādi vairāku reakciju procesā tiek sintezētas jaunas polifenolu grupas. Piemēram, galluskābe sintezējas no šikimskābes, bet galluskābes dimērs ir ellagskābe, kas pieder pie ellagtanīnu grupas.

Par polifenolu bāzes vienībām var uzskatīt galluskābi un kanēļskābi, jo no šiem savienojumiem tālāk sintezējas citu polifenolu grupu pārstāvji, piemēram, kanēļskābe piedalās izoflavonu biosintēzē (Knaggs, 2001).

2.4.2. Polifenolu klasifikācija

Polifenoli ir ķīmiski savienojumi, kuru molekulās ir vairāki fenolu gredzeni. Ķīmiskās struktūras ziņā starp fenolu savienojumiem pastāv liela dažādība – savienojumi var būt gan monomēri (vienkāršas molekulas), gan sarežģītas struktūras polimēri (lielmolekulāri savienojumi) (Cheynier, 2005).

Augos esošos fenolus var iedalīt divās lielās grupās: 1) fenolskābes (oksiskābes) un to atvasinājumi; 2) flavonoīdu (polifenolu) savienojumi. Pēc struktūras vienkāršākās ir fenolskābes, kā arī to atvasinājumi, kas galvenokārt ir vienkārši ēsteri. Fenolskābes veido daudzpusīgu savienojumu grupu, kuras pārstāvji ir kafijskābe, kumarīnskābe, vanilīns, galluskābe (Cheynier, 2005).

Sarežģītāka molekulārā uzbūve ir flavonoīdu grupas savienojumiem, kam parasti molekulas centrā ir heterocikls ar piesaistītu(iem) fenola gredzenu(iem). Flavonoīdi ietver arī antociānidīnus (ūdenī šķīstošu pigmentu grupa, kas ir oksidēti flavonoli), katehīnus, izoflavonus un proantociānidīnus.

Tabula 2. Flavonoīdu iedalījums *

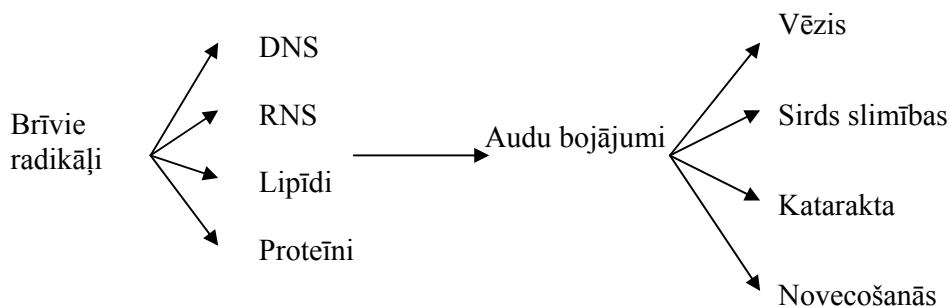
Flavonoīdu grupa	Savienojumi
Antociānidīni	Cianidīns, delfinidīns, malvidīns, petunidīns, pelargonidīns
Flavanoli	Katehīni, gallokatehīns, epikatehīni, epigallokatehīni
Flavonoli	Kvercētīns, kamferols, ramnazīns, miricētīns
Flavanoni	Hesperetīns, naringenīns, eriodiktiols
Flavoni	Apigenīns, tangeritīns
Izoflavonoli	Genisteīns, daidzeīns, gliciteīns

* <http://www.metabolome.jp/software/FlavonoidViewer>

2.4.3. Polifenoli kā funkcionālā uztura sastāvdaļa

Polifenoli ir nozīmīga augos esoša ķīmisko vielu grupa, kurai ir pētīta loma deģeneratīvo slimību, galvenokārt, vēža un kardiovaskulāro slimību novēršanā. Agrāk polifenolu iedarbību saistīja ar to antioksidantu efektu (Czerwiecki, 2009; Biesalski, 2007), jo uzskatīja, ka polifenoli ir vislielākā un visizplatītākā augu fitoķīmisko vielu grupa, kas organismā darbojas kā antioksidanti. Tie aizsargā šūnas pret brīvo radikāļu radītajiem bojājumiem – oksidatīvo stresu, kad organisms nespēj veikt pilnīgu brīvo radikāļu neutralizēšanu, rezultātā izraisot saslimšanas (Lambert et al., 2005).

Tomēr pēdējā laikā kritiski izvērtējot antioksidantu efektus *in vivo*, atklājas atšķirības *in vitro* un *in vivo* eksperimentos. Jaunākie pētījumi liecina, ka polifenoli varētu darboties, tieši saistoties ar šūnas kodola receptoriem un tādējādi modulējot šūnas signālceļu kaskādes (Tirzitis and Bartosz, 2010; Virgili and Marino, 2008).



1. att. Brīvo radikāļu loma slimību attīstībā.

Aizsardzība pret brīvajiem radikāļiem tiek panākta ar lipīdu peroksidācijas kavēšanu; oksidēšanos veicinošo metālu jonu (Fe^{3+} , Cu^{2+}) saistīšanu, kā arī nodrošinot daudzus reaktīvo skābekļa, hlora un slāpekļa aktīvo formu neitralizāciju.

Daudzi augos esošie polifenolu savienojumi pētījumos uzrāda pretiekaisuma un pretvēža aktivitāti (Lambert et al., 2005; Biesalski, 2007). Kaut gan daži klīniskie pētījumi liecina, ka izoflavoni aizsargā organismu pret estrogēnatkarīgo vēzi (krūts vēzis, olnīcu vēzis) veidošanos (Messina and Messina, 2003; Arai et al., 2000), tomēr tiek uzsvērta nepieciešamība agri uzsākt profilaktisku izoflanonu lietošanu (Messina and Hilakivi-Clarke, 2009). Jāatzīmē, ka polifenolu antioksidatīvā un pretvēža aktivitāte ir pārliecinoši pierādīta *in vitro* pētījumos, tomēr *in vivo* pētījumos tā ir pierādīta tikai daļēji. Epidemioloģiskos novērojumos ir konstatēts, ka regulāra augļu un dārzeņu lietošana uzturā, samazina saslimstību ar deģeneratīvām slimībām. Tomēr nevar kategoriski norādīt, ka šo slimību attīstību kavē tikai augu valsts produktos esošie polifenoli. Polifenoli var samazināt vēža augšanai nepieciešamo enzīmu aktivitāti un inaktivēt vielas, kas veicina vēža attīstību, pārveidojot tos par mazāk aktīviem savienojumiem, pirms tie sasniedz DNS. Polifenoli inhibē dažus citohroma P450 (CYP450) kompleksa enzīmus, kas, metabolizējot prokancerogēnus, veido aktīvus savienojumus, kuri spēj saistīties ar DNS un pastiprināt ļaundabīgo audzēju attīstību. Nomācot šo CYP450 enzīmu aktivitāti, polifenoli samazina vēža attīstības risku (Messina and Hilakivi-Clarke, 2009).

Pētījumos *in vitro* daudzi no šiem savienojumiem uzrāda ietekmi uz signāltransdukcijas ceļiem, kas izraisa šūnu augšanas un transformācijas inhibīciju, pastiprinātu apoptozi, samazinātu agresīvu uzvedību un palēninātu angiogēnēzi (Lambert et al., 2005). Polifenolu izraisītās kancerogēneses inhibīcijas mehānisms var

būt šūnu augšanas inhibīcija, apoptozes indukcija un arahidonskābes metabolisma inhibīcija.

Novērots, ka polifenoli pazemina glikozes un holesterīna līmeni. Glikozes līmeni pazeminošais efekts ir izskaidrojams ar polifenolu spēju inhibēt amilāzes (enzīmus, kas katalizē cietes hidrolīzes reakciju, rezultātā veidojot glikozi) un fosforilāzes (enzīmus, kas ir iesaistīti cietes metabolismā). Polifenoli nomāc proteolītiskos enzīmus, kas gastrointestinālajā traktā katalizē proteīnu hidrolīzes reakcijas (Arai et al., 2000).

In vivo pētījumos atklāts, ka zema blīvuma lipoproteīnu oksidēšanās ir galvenais sirds slimību attīstības iemesls. Iespējams, ka hlorogēnskābe un citi polifenoli var samazināt sirds slimību risku, jo *in vitro* pētījumos tie uzrāda spēcīgu zema blīvuma lipoproteīnu antioksidatīvo darbību (Arai et al., 2000).

2.4.4. Polifenoli kartupeļos

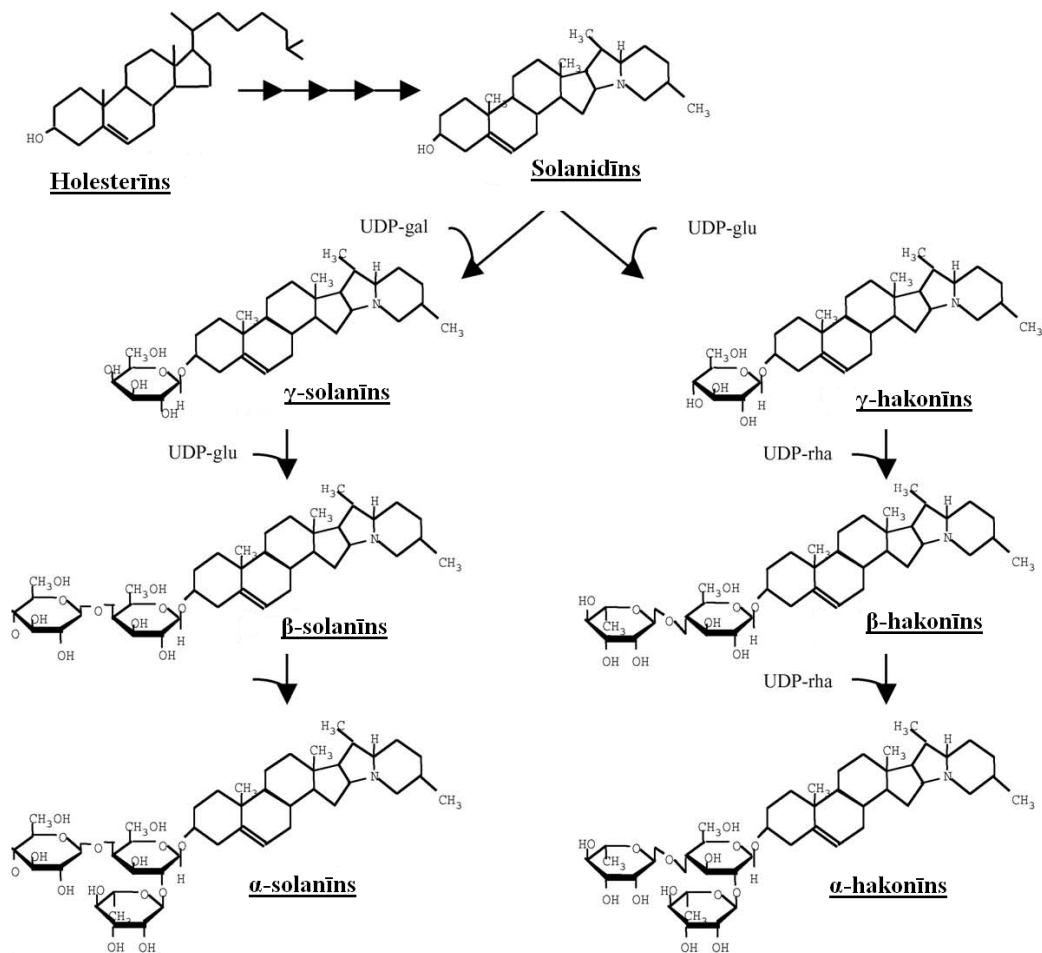
Kartupeļi līdzīgi kā citi dabas produkti satur daudzpusējas darbības spektra aktīvās vielas (Andre et al., 2007; Ashwell, 2001). Viena no aktīvo vielu grupām, kas konstatēta kartupeļos, ir polifenoli. Mizā fenolu savienojumu daudzums ir desmit reizes augstāks kā pārējā kartupeļu bumbuļi (Shirama-Kian et al., 2008). Tomēr kopējais fenolu saturs kartupeļos procentuāli ir zems. Galvenie kartupeļu bumbuļos esošie fenolu savienojumi ir L-tirozīns, kafijskābe, skopolīns, galluskābe, p-kumarīnskābe, kriptohlorogēnskābe. Kartupeļu bumbuļos ir dažādu grupu polifenolu savienojumi – antocianīni (augu pigmenti), flavanoni (naringenīns), flavan-3-oli (katehīns, epikatehīns) un arī flavonoli (kemferols, kvercetinā glikozīdi). Kartupeļu bumbuļos kafijskābes daudzums ir 0,2 – 3,2 mg/kg, neohlorogēnskābes daudzums 7 mg/kg, p-kumarīnskābes saturs 4 mg/kg, kā arī atrasti ferulīnskābes amīdi un kvercetinā, petunidīna, delfinidīna glikozīdi (Lachman et al., 2001).

Polifenolu saturs kartupeļu bumbuļos var svārstīties un tas ir atkarīgs no dažādiem faktoriem - uzglabāšanas ilguma (rudenī kartupeļos polifenolu saturs ir augstāks kā pavasarī) un audzēšanas laikā pielietotajām nezāļu apkarošanas metodēm. Atkarībā no tā, kādā vidē kartupeļi audzēti, kopējais fenolu savienojumu saturs var svārstīties no 36,85 – 52,89 mg/100g svaigas masas (Lachman et al., 2001).

2.5. Glikoalkaloīdi

2.5.1. Glikoalkaloīdu biosintēze

Glikoalkaloīdi arī ir uzskatāmi par sekundārajiem metabolītiem, kas augā sintezējas no holesterīna, kas savukārt sintezējas no cikloartenola.



2. att. Glikoalkaloīdu biosintēze (McCue et al., 2005)

Glikoalkaloīdu biosintēzes process iedalāms vairākos posmos:

1. posms - no holesterīna izveidojas glikoalkaloīdu aglikons – solanidīns.

2. posms – no solanidīna un UDP-galaktozes, kā katalizatoram piedaloties galaktoziltransferāzei, veidojas γ -solanīns. Savukārt no solanidīna un UDP-glikozes katalizatora glikoziltransferāzes klātienē veidojas γ -hakonīns.

3. posms – no γ -solanīna un UDP-glikozes, glikoziltransferāzei katalizējot reakciju, veidojas β -solanīns. Savukārt no γ -hakonīna un UDP-ramnozes, ar ramnoziltransferāzi kā katalizatoru, veidojas β -hakonīns.

4. posms – no β -solanīna un β -hakonīna, kā arī UDP-ramnozes, ar ramnoziltransferāzi kā katalizatoru, veidojas attiecīgi α -solanīns un α -hakonīns (McCue et al., 2005; Lachman et al., 2001).

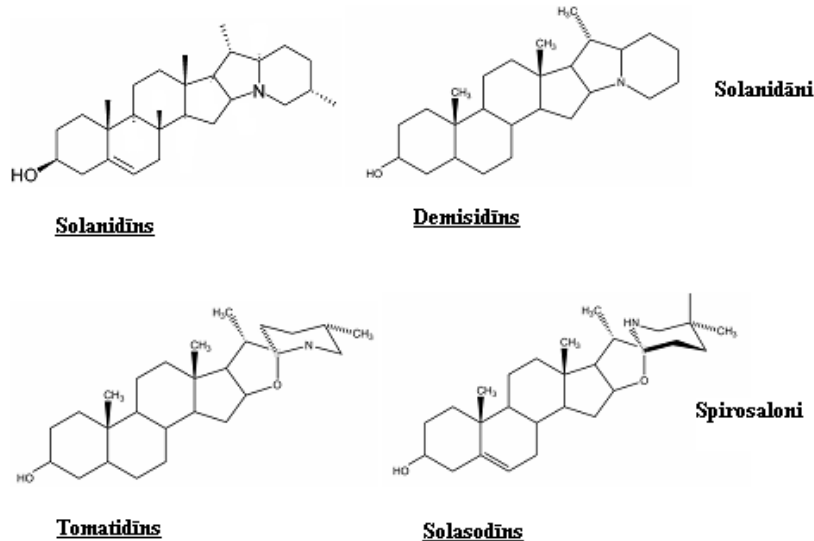
2.5.2. Glikoalkaloīdi nakteņu dzimtas augos

Nakteņu dzimtas (*Solanaceae*) augos dažādos daudzumos sintezējas glikoalkaloīdi, kas ir no aglikona un cukura molekulu kombinācijām veidojušies slāpekli saturoši steroīdie glikozīdi. Struktūras atšķirības ir C-C dubultās saites esamība vai tās trūkums, funkcionālo grupu dažādība, kā arī šo funkcionālo grupu stereoķīmija.

Glikoalkaloīdu aglikoni pēc struktūras tiek iedalīti piecās dažādās kategorijās:

- 1) solanidāni, kas veidoti no indolizidīna gredzeniem;
- 2) spirosaloni, kam ir oksaazaspirodekāna alkaloīda daļa;
- 3) 22,26 – epiminoholestāni;
- 4) α -epiminociklohemiketāli;
- 5) 3-aminospirostāni (Vaananen, 2007).

Lielākā daļa nakteņu dzimtā konstatēto glikoalkaloīdu pieder pie solanidāniem un spirosaloniem.



3. att. Glikoalkaloīdu aglikonu piemēri (Friedman, 2004)

Aglíkoni saistās ar dažādām cukura molekulām, veidojot glikoalkaloīdus. Cukura molekulu skaits, ar kuriem saistās aglīkoni var būt dažāds, tomēr vairumā gadījumu tās ir trīs vai četras cukura molekulas. Pastāv dažādas kombinācijas, kā aglīkoni saistās ar cukura molekulām: glikozi, galaktozi, ksilozi un ramnozi.

Retāk ir novērota aglīkonu saistīšanās ar vienu vai divām cukura molekulām. Šādas kombinācijas ir konstatētas kartupeļos (γ -hakonīns; β -solanīns).

Visizplatītākie solanidānu grupas aglīkoni ir solanidīns un tā dihidrogenētā forma – demisidīns. Solanidīns kopā ar trīs cukura molekulām (glikozi, galaktozi un ramnozi) veido glikoalkaloīdu α -solanīnu, savukārt α -hakonīns veidojas solanidīnam saistoties ar glikozi un divām ramnozes molekulām.

Spirosalonus grupā visbiežāk sastopamais aglīkons ir tomatidīns, kas kombinācijā ar cukura molekulām veido glikoalkaloīdu α -tomatīnu, kas sastopams daudzās augu sugās, piemēram, tomātos. Dehidrogenēts tomatidīna aglīkons, kas tomātu augos bieži tiek noteikts kopā ar tomatidīna struktūru, ir dehidrotomatidīns. Daudzos nakteņu dzimtas augos ir konstatēti aglīkonu tomatidīna un dehidrotomatidīna 22,25-diaistereizomērie pāri – soladulcidīns un solasodīns.

Tabula 3. Solanidīnu un spirosalonu grupas glikoalkaloīdi nakteņu (*Solanum*) ģintī

Glikoalkaloīds	Aglīkons	Cukura molekulas	Nakteņu ģints augu sugas
α- Solanīns (Deahl et al., 1993)	solanidīns	glikoze – galaktoze - ramnoze	S. tuberosum; S. chacoense; S. vernei
α- Hakonīns (Deahl et al., 1993)	solanidīns	glikoze – ramnoze - ramnoze	S. tuberosum; S. vernei; S. candolleanum
Dehidrodemisīns (Carputo et al., 2003)	solanidīns	ksiloze – glikoze – glikoze - galaktoze	S. commersonii
Demisīns (Carputo et al., 2003)	demisidīns	ksiloze – glikoze – glikoze - galaktoze	S. commersonii; S. acaule; S. demissum
α – Tomatīns (Deahl et al., 1993)	tomatidīns	ksiloze – glikoze – glikoze - galaktoze	S. lycopersicum; S. demissum; S. brevicens
α – Solamarīns (Deahl et al., 1993)	dehidrotomatidīns	glikoze – galaktoze - ramnoze	S. medians; S. candolleanum
β – Solamarīns (Griffiths et al., 2000)	dehidrotomatidīns	glikoze – ramnoze - ramnoze	S. phureja; S. trilobatum
β – Soladulcidīns (Schreiber, 1958)	soladulcidīns	glikoze – galaktoze - ramnoze	S. dulcamara; S. lyratum
Solamargīns (Deahl et al., 1993)	solasodīns	glikoze – ramnoze - ramnoze	S. paludosum; S. ambosinum; S. vernei

Glikoalkaloīdi ir atrasti dažādos augļos un dārzeņos, piemēram, ābolos, ķiršos, cukurbietēs, paprikā; tomēr galvenokārt glikoalkaloīdus satur nakteņu dzimtas augi, tostarp arī kartupeļi.

2.5.3. Glikoalkaloīdi kartupeļos

Kartupeļos 95% no kopējā glikoalkaloīdu daudzuma veido α -solanīns un α -hakonīns, tomēr nelielos daudzumos ir konstatētas citas solanidīna kombinācijas ar dažādām cukura molekulām. Parasti glikoalkaloīdu α -solanīna un α -hakonīna savstarpējā attiecība kartupeļu bumbuļos ir 40:60, bet tā var arī mainīties.

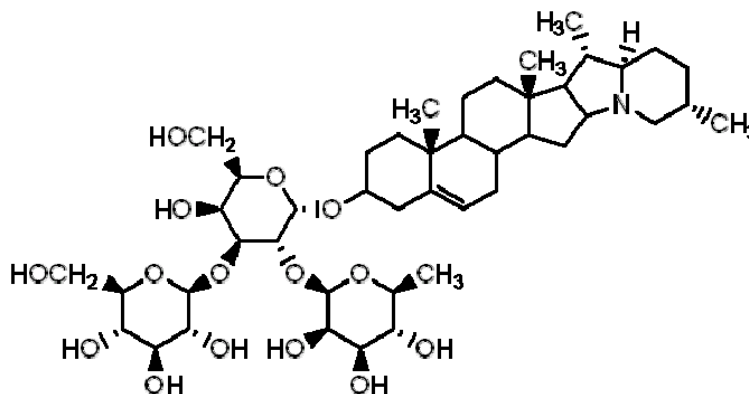
Tabula 4. Glikoalkaloīdi kartupeļos (Vaananen, 2007)

Glikoalkaloīds	Aglikons	Cukura molekulas
α -solanīns	Solanidīns	Solatrioze: galaktoze + glikoze + ramnoze
α -hakonīns	Solanidīns	Hakotrioze: glikoze + ramnoze + ramnoze
β -solanīns	Solanidīns	Solabioze: galaktoze + glikoze
β -hakonīns	Solanidīns	Hakobioze: glikoze + ramnoze
β_2 -solanīns	Solanidīns	Solabioze: galaktoze - ramnoze
γ -solanīns	Solanidīns	Galaktoze
γ -hakonīns	Solanidīns	Glikoze

Glikoalkaloīdi pasargā augus pret kukaiņiem un citiem kaitēkļiem, bet augstās devās tie ir spējīgi izraisīt dažādus toksiskus efektus cilvēkiem un dzīvniekiem (Abreu et al., 2007; Jensen et al., 2008; Mensinga et al., 2005). α -Solanīns un α -hakonīns ir toksiski cilvēkiem devās 3 – 5 mg/kg, bet letālā deva (LD₅₀) ir 3 – 6 mg/kg (Jensen et al., 2008). Glikoalkaloīdi kartupelim dod sūru garšu.

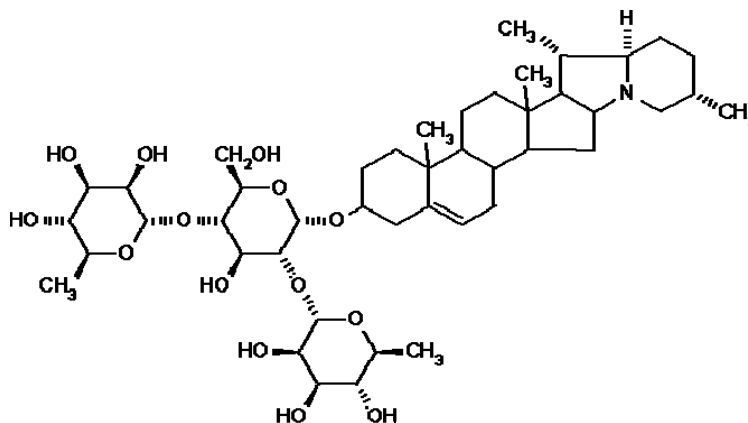
Ķīmiski glikoalkaloīdi – α -solanīns un α -hakonīns – sastāv no nepolāra lipofīla steroīda kodola, kurš ir kondensēts ar slāpekli saturošu heterociklisku gredzenu (aglikons) un saistīts ar trisaharīdu. Šie savienojumi ir aglikona – solanidīna – atvasinājumi, kur katrs satur trīs cukura molekulas (Friedman, 2004).

1820. gadā tika atklāts „solanīns” un tikai vēlāk zinātnieki pierādīja, ka patiesībā „solanīns” ir divu dažādu glikoalkaloīdu α -solanīna un α -hakonīna maisījums, jo abiem savienojumiem ir viens aglikons, bet atšķirīgas cukura molekulas.



4. att. α – Solanīna struktūra (Friedman, 2004)

α -Solanīns sastāv no solanidīna un trīs cukura molekulām: galaktozes, glikozes un ramnozes. α -Solanīna molekulas formula ir $C_{45}H_{73}NO_{15}$. α -Solanīna trisaharīds tiek saukts vienā vārdā par solatriozi (Backleh et al., 2004).



5. att. α -Hakonīna struktūra (Friedman, 2004)

α -Hakonīns sastāv no solanidīna un glikozes, kā arī divām ramnozes molekulām, kopā šīs cukura molekulas sauc par hakotriozi (Backleh et al., 2004). α -Hakonīna molekulas formula ir $C_{45}H_{73}NO_{14}$.

Visi kartupeļos konstatētie alkaloidi ir glikozīdu formā, to aglikoni sastāv no 27 oglekļa atomiem un viena slāpekļa atoma. Visiem glikoalkaloīdiem ir holesterīna skelets ar $-OH$ grupu pie tā trešās pozīcijas.

2.5.4. Glikoalkaloīdu saturs dažādās kartupeļu daļās

Glikoalkaloīdu līmenis dažādās kartupeļu auga daļās ir atšķirīgs. Glikoalkaloīdi ir konstatēti gandrīz visās kartupeļu auga daļās, tomēr augstākās koncentrācijās tie parasti ir tajās auga daļās, kas pakļautas augstai metaboliskai aktivitātei (Lachman et al., 2001; Deahl et al., 1993). Glikoalkaloīdi kartupeļiem piešķir patīkamu garšu un smaržu, bet augstākās koncentrācijās tie garšu padara rūgtu, un tie pat ir toksiski cilvēkiem. Tie pilda arī nozīmīgu aizsargfunkciju, pasargājot kartupeļus no dažādām baktērijām, sēnītēm, vīrusiem, insektiem un pat dzīvniekiem (Everard et al., 1997).

Kartupeļu ziedi, nenogatavojušās kartupeļu ogas, jaunās lapas, kartupeļu asni un vietas uz bumbuļa apkārt kartupeļu acīm ir tās auga daļas, kurās glikoalkaloīdu koncentrācija ir visaugstākā. Lielākā α -solanīna koncentrācija ir kartupeļu bumbuļu mizā vai tieši zem tās, kur glikoalkaloīdu koncentrācija ir 3 līdz 10 reizes augstāka nekā pašā kartupelī. Salīdzinājumā ar pārējo auga daļu kartupeļu bumbuļos glikoalkaloīdu līmenis ir daudz zemāks (Vaananen, 2007). Pasaules Veselības organizācijas (PVO) atļautais augstākais glikoalkaloīdu daudzums kartupeļos kā pārtikas produktā ir 20 mg uz 100 g kartupeļu. To koncentrācija ir atkarīga no augsnes apstākļiem kartupeļu augšanas laikā. Vidējais glikoalkaloīdu daudzums kartupeļa mizā var svārstīties no 3 mg līdz pat 100 mg uz 100 g mizu (Bushway et al., 1983). Zinātnieki uzsver, ka visām reģistrētajām un pārtikā lietojamām kartupeļu šķirnēm glikoalkaloīdus vajadzētu saturēt zem 50 mg/kg, jo tad iespējamība sasniegt veselībai bīstamo glikoalkaloīdu daudzumu (200 mg/kg) būtu relatīvi zema (Zarzecka et al., 2007).

Augstāks glikoalkaloīdu līmenis ir mazos kartupeļu bumbuļos (jaunajos kartupeļos), tomēr, kartupeļiem nobriestot un to izmēram palielinoties, glikoalkaloīdu līmenis samazinās (Vaananen, 2007). Saasnojušiem kartupeļiem kopējais glikoalkaloīdu līmenis ir lielāks un koncentrācija mizā un bumbuļa iekšējā daļā ir augstāka nekā nesaasnojušiem kartupeļiem (Tomoskozi–Farkas et al., 2006). Glikoalkaloīdi α -hakonīns un α -solanīns ir atrasti arī svaigās, neapstrādātās kartupeļu lapās, kur glikoalkaloīdu aglikona solanidīna daudzums ir 396 mg/kg (Lachman et al., 2001).

Lai novērstu saindēšanos ar glikoalkaloīdiem toksiskā daudzumā, ir jāpievērš nopietna uzmanība ne tikai kartupeļu audzēšanas procesam un augsnes atbilstībai, bet arī to uzglabāšanas apstākļiem pēc ražas novākšanas (Cantwell et al., 1996). Kartupeļu mizas krāsas maiņa uz zaļu ir cieši saistīta ar glikoalkaloīdu koncentrācijas palielināšanos (Everard et al., 1997). Visā pigmenta veidošanās reakcijas procesā ļoti svarīga loma ir pH līmenim. Vispiemērotākie apstākļi zaļošanai ir pie pH no 9.0 līdz 9.5. Pie pH 7.0 zaļošana notiek ļoti lēni, savukārt pie pH 10.5 reakcija notiek ļoti ātri, bet bez ievērojamas zaļās krāsas intensitātes (Goro et al., 2001). Ir novērots, ka daudz lielāka tendence sintezēt hlorofilu ir nenobriedušiem un maza izmēra kartupeļiem, nevis lielāka izmēra kartupeļiem (Everard et al., 1997).

2.5.5. Glikoalkaloīdu līmeni ietekmējošie faktori

Pastāv dažādi faktori, kas ietekmē kartupeļu bioaktīvo vielu, tostarp glikoalkaloīdu līmeni. Glikoalkaloīdu uzkrāšanās kartupeļu bumbuļos ir komplekss process – to kopējais daudzums ir atkarīgs no daudziem faktoriem: ģenētiskām īpašībām, gaismas, temperatūras, klimata, augsnes tipa un apstrādes, augsnes bagātināšanas metodēm, nezāļu apkarošanas metodēm, bumbuļu izmēriem, mehāniskiem bojājumiem un uzglabāšanas apstākļiem (Tajner et al., 2008; Machado et al., 2007; Zarzecka and Gugata, 2007; Zhuk et al., 2008). No visiem faktoriem, kas ietekmē glikoalkaloīdu koncentrāciju kartupeļu bumbuļos, vislielākā nozīme ir kartupeļu šķirnei, gaismas ietekmei un gatavības pakāpei. Glikoalkaloīdu sintēze gaismas ietekmē var notikt gan uz lauka, kurā kartupeļi aug, gan arī novācot ražu vai uzglabājot to. Ir pierādīts, ka gaismas ietekmē kopējais glikoalkaloīdu līmenis kartupeļu bumbuļos var palielināties 2 – 3 reizes, bet luminiscējoša apgaismojuma ietekmē pat 4 – 6 reizes (Machado et al., 2007). Pētījumos atklāts, ka kartupeļu uzglabāšana gaismā, mehāniski bojājumi un radiācija paaugstina glikoalkaloīdu daudzumu un kartupeļu uzglabāšanas apstākļiem pēc novākšanas ir lielāka ietekme uz glikoalkaloīdu daudzumu kā klimata un augsnes ietekmei (Friedman and McDonald, 1999).

Glikoalkaloīdu līmeni kartupeļos var ietekmēt arī ģenētiskie faktori (kartupeļu šķirne), apkārtējās vides un agrotehnoloģiskie faktori. Augsnes apstrādes tehnoloģijas un nezāļu apkarošanas metodes (ieskaitot herbicīdu izmantošanu) nozīmīgi ietekmē glikoalkaloīdu uzkrāšanos kartupeļu bumbuļos. Kopējais glikoalkaloīdu līmenis ir augstāks kartupeļos, kuriem nezāļu apkarošanai izmantoti herbicīdi, nekā kartupeļos, kuri audzēti bez ķīmikālijām (Zarzecka and Gugata, 2007).

Viena no augsnes apstrādes tehnoloģijām, kas ietekmē glikoalkaloīdu daudzumu kartupeļu bumbuļos, ir augsnes mēslošana. Zinātnieki konstatējuši - ja augsnē ir paaugstināts slāpekļa un magnija daudzums, pieaug arī glikoalkaloīdu līmenis kartupeļu bumbuļos (Tajner et al., 2008; Lachman et al., 2001), bet kālijs samazina glikoalkaloīdu daudzumu kartupeļu bumbuļos. Glikoalkaloīdu sintēzei ir nepieciešama reducēto cukuru klātbūtne. Ja kālija līmenis kartupeļu bumbuļos ir samērā augsts, tad reducēto cukuru līmenis ir zems, līdz ar to samazinās arī glikoalkaloīdu sintēze (Zarzecka and Gugata, 2007).

Glikoalkaloīdu daudzuma izmaiņām ir parabolisks raksturs: pirms kartupeļu ziedēšanas glikoalkaloīdu daudzums ir zems, visaugstākais tas ir pēc kartupeļu ziedēšanas un kartupelim nobriestot, glikoalkaloīdu daudzums kartupeļu bumbuļos samazinās.

Būtiska nozīme glikoalkaloīdu uzkrāšanai kartupeļu bumbuļos ir laika apstākļiem. Trīs gadus (no 2002. līdz 2004. gadam) vērojot apkārtējās vides un agrotehnoloģisko faktoru ietekmi uz kartupeļiem, novērots, ka visaugstākais glikoalkaloīdu saturs kartupeļu bumbuļos bijis 2003. gadā, kad bija silts, sauss laiks un reģistrētas augstas gaisa temperatūras (Zarzecka and Gugata, 2007). Savukārt viszemākais glikoalkaloīdu līmenis reģistrēts 2004. gadā izaugušajos kartupeļos, kad nokrišņu daudzums bijis neliels un vienmērīgs visa veģetācijas perioda laikā, kā arī nav bijušas augstas gaisa temperatūras (optimāli laika apstākļi). No tā varam secināt, ka auksts laiks un liels nokrišņu daudzums, kā arī karsts laiks un ūdens trūkums kartupeļu augšanas laikā veicina glikoalkaloīdu sintēzes līmeņa palielināšanos kartupeļu bumbuļos.

Viens no faktoriem, kas samazina pārtikā uzņemto glikoalkaloīdu daudzumu, ir kartupeļu mizošana un pagatavošana. Kartupeļu apstrāde ievērojami samazina kopējo glikoalkaloīdu līmeni, lielāks glikoalkaloīdu zudums vērojams, ja kartupeļi tiek mizoti. Tas izskaidrojams ar to, ka lielākā daļa glikoalkaloīdu kartupeļu bumbuļos ir koncentrēti mizā un tieši zem tās. Ir pierādīts, ka kartupeļu mizošana kopējo glikoalkaloīdu daudzumu samazina par 58% - hakonīna līmenis samazinās par 54%, bet solanīna par 67% (Tajner et al., 2008).

2.5.6. Glikoalkaloīdu loma augos

Glikoalkaloīdi ir vieni no augos esošajiem ķīmiskajiem savienojumiem, kas pasargā augus pret baktērijām un citiem parazītiem. Kartupeļos glikoalkaloīdu līmenis paaugstinās kā atbildes reakcija uz baktēriju izraisītu puvi (Lachman et al., 2001). α -hakonīnam piemīt fungicīdas, nematodes iznīcinošas spējas, tas darbojas arī kā pesticīds, un arī α -solanīns darbojas kā pesticīds un fungicīds. Visspēcīgākie efekti piemīt tomatīnam. Tas darbojas kā fungicīds un pesticīds; tomatīnam piemīt arī baktericīda iedarbība un tas aizsargā augus pret gliemjiem (Lachman et al., 2001).

Augsts glikoalkaloīdu līmenis palielina izturību pret vīrusu un mikroorganismu izraisītām slimībām, piemēram, baktēriju izraisītu mīksto puvi; pret dažādu kukaiņu

nevēlamo iedarbību (cikādēm, kartupeļu lapgrauzi un tumšo sprakšķi), kas izalo kartupeļu bumbuļus (Arnqvist, 2007).

2.5.7. Glikoalkaloīdu ietekme uz šūnām, dzīvnieku un cilvēka organismu

2.5.7.1. Glikoalkaloīdu toksiskie efekti

Visbiežāk glikoalkaloīdu izraisīta saindēšanās izpaužas kā akūta saindēšanās. Daudzos gadījumos akūtas saindēšanās iemesls ir ne tikai zaļu, bet arī bojātu vai saasnojušu kartupeļu nepareiza lietošana pārtikā (Maga, 1980). Cilvēkiem akūtas saindēšanās sindroms tiek novērots, ja uzņemto glikoalkaloīdu līmenis ir apmēram 2,8 mg/kg ķermeņa masas (Jadhaw et al., 1981). Sākotnēji tika uzskatīts, ka hroniska glikoalkaloīdu izraisīta saindēšanās saistīta gan ar α -solanīna, gan α -hakonīna uzkrāšanos audos, tomēr šiem glikoalkaloīdiem pēc orālas ieņemšanas ir zema absorbēšanās spēja gastrointestinālajā traktā. No organisma glikoalkaloīdi tiek izvadīti salīdzinoši ātri (apmēram 12 stundu laikā) ar urīnu un ekskrementiem, tādējādi tiek novērsta šo savienojumu uzkrāšanās audos. Glikoalkaloīdu detoksikācijā piedalās arī zarnu baktērijas, kuras hidrolizē glikoalkaloīdus aglikonā – solanidīnā, kas ir mazāk toksisks nekā α -solanīns un α -hakonīns (Korpan et al., 2004; Patel et al., 2002).

Salīdzinot γ -solanīna un γ -hakonīna toksicitāti ar α -solanīna un α -hakonīna, γ -solanīnam un γ -hakonīnam novēro mazāk toksisku iedarbību. Glikoalkaloīdu bioloģisko aktivitāti ietekmē šo savienojumu sastāvā esošo ogļhidrātu (glikozes, galaktozes vai ramnozes) ķīmiskā struktūra; ogļhidrātu grupu skaits, veidojot sānu ķēdi pie aglikona solanidīna, kā arī stereoķīmiskā konfigurācija (Lachman et al., 2001). Glikoalkaloīdu toksicitāti skaidro ar acetilholīnesterāzes (AChE) un butirilholīnesterāzes (BuChE) inhibēšanu (tiek imitēta vai bloķēta nervu transmitteru darbība), kā rezultātā tiek traucētas normālas neirālās funkcijas (Krasowski et al., 1997). Starp apmēram 5000 augos konstatētiem toksīniem glikoalkaloīdi ir vienīgie, kas inhibē gan AChE, gan BuChE (Laurila et al., 1999). α -Solanīnam un α -hakonīnam ir spēcīgāka iedarbība uz BuChE nekā uz AChE (McGehee et al., 2000). Ir pierādīts, ka

glikoalkaloīdi inhibē BuChE pat pie tādas α -solanīna un α -hakonīna koncentrācijas, kāda tiek uzņemta, ja indivīds uzturā lietojis nebojātus un nesazaļojušus kartupeļus (McGehee et al., 2000). BuChE sauc arī par seruma holīnesterāzi, bet tā nepiedalās acetilholīna hidrolīzē. Tā neitralizē holīnesterāzes inhibitorus, kā arī hidrolizē un ierobežo darbības ilgumu neiromuskulāro funkciju bloķējošiem aģentiem – mivakurīnam un sukcinilholīnam.

Vēl glikoalkaloīdi, līdzīgi saponīniem, izraisa šūnu membrānu sairšanu, saistoties ar 3 β -hidroksisteroliem un izmainot jonu aktīvo transportu caur šūnu membrānām. Tādējādi tie rada gastrointestinālus traucējumus un vispārējus organisma vielmaiņas traucējumus (Lachman et al., 2001). Gastrointestinālie traucējumi – vēdera sāpes, vemšana, caureja - parasti tiek novēroti, ja notiek saindēšanās ar glikoalkaloīdiem zemās devās. Uzņemot lielāku glikoalkaloīdu daudzumu, cilvēkiem novēro nopietnākus saindēšanās simptomus: drudzis, pazeminātu pulsu, zemu asinsspiedienu, paātrinātu elpošanu un neiroloģiska rakstura traucējumus (Korpan et al., 2004).

Ir pierādīts, ka kartupeļu glikoalkaloīdi nelabvēlīgi ietekmē zarnu caurlaidību un saasina zarnu iekaisuma slimības. Glikoalkaloīdi zarnu šūnu sienīnās saistās ar holesterīnu; palielinoties glikoalkaloīdu daudzumam, membrānas slāņa virsma tiek izliekta un pēc tam pārrauta. Glikoalkaloīdu darbības mehānisms epiteliālajā barjerā ir saistīts ar holesterīna un glikoalkaloīdu līdzību un to spēju iekļūt holesterīnu saturošajās membrānās (Patel et al., 2002).

Mitochondrijos solanīns atver kālija kanālus, palielinot membrānu potenciālu. Tas rada Ca^{2+} jonu izplūšanu no mitohondrijiem un Ca^{2+} jonu pieaugumu šūnā, kas, savukārt, rada šūnu bojājumus un apoptozi (Patel et al., 2002).

No kartupeļos esošajiem glikoalkaloīdiem α -hakonīns uzrāda vislielāko iedarbīgumu *Herpes simplex* vīrusa inaktivēšanā, bet α -solanīns paaugstina cukura līmeni asinīs un rada hiperglikēmisku efektu (Lachman et al., 2001).

2.5.7.2. Glikoalkaloīdu ārstnieciskie efekti

Atsevišķi pētījumi ir pierādījuši, ka kartupeļu sastāvā esošie glikoalkaloīdi ne tikai inaktivē *Herpes simplex* vīrusu, bet arī aizsargā pret infekciju, ko izraisa *Salmonella typhimurium*, stimulē malārijas vakcīnas darbību, pazemina holesterīna līmeni plazmā un inhibē cilvēka resnās zarnas vēža šūnu HT29 augšanu (Friedman,

2004). 2001.gadā tika publicēti pētījumi par kartupeļu ekstrakta spēju *in vitro* nomākt krūts vēža šūnu augšanu (De Lorenzo et al., 2001). Citos eksperimentos ar žurkām kartupeļu ekstrakts pasargāja žurku aknu hepatocītus no gamma starojuma bojājumiem, kas liecina par radioprotektīvām īpašībām (Kim et al., 1994).

Solanīns un hakonīns gan individuāli, gan arī darbojoties sinerģiski pazemina HeLa, aknu (HepG2), limfomas (U937), kuņģa (AGS un KATO III) vēža šūnu dzīvotspēju (Friedman et al., 2005; Lee et al., 2004).

AChE inhibitoru pielietošana ir viena no Alcheimera slimības kognitīvo simptomu ārstēšanas metodēm un viena no iespējamām Parkinsona slimības, vecuma plānprātības un ataksijas (kustību koordinācijas un līdzsvara traucējumu) ārstēšanas metodēm. Visizplatītākie dabīgie AChE inhibitori – glikoalkaloīdi – ir atrasti nakteņu dzimtas augos, piemēram, kartupeļos, tomātos un baklažānos (McGehee et al., 2000). Glikoalkaloīdi, kas darbojas kā AChE inhibitori, atsevišķu slimību gadījumos (piem., Alcheimera slimība) teorētiski varētu dot vēlamu efektu, tomēr veselam cilvēkam AChE inhibīcija nav nepieciešama, jo tādējādi var tikt izraisīti neirālo funkciju bojājumi.

Nozīmīga ietekme uz cilvēka veselību ir arī citos nakteņu dzimtas augos esošajiem glikoalkaloīdiem: α -solamargīnam, α -solasolīnam un aglikonam solasodīnam, kuriem piemīt pretvēža aktivitāte (Korpan et al., 2004). Solamargīns, kas iegūts no *Solanum incanum*, tika izmantots, lai izpētītu pretvēža aktivitāti cilvēka hepatomas šūnās (Hep3B) un raksturotu pārmaiņas šūnu morfoloģijā, DNS sastāvā un gēnu ekspresijā šūnās pēc ārstēšanas ar solamargīnu. Cilvēka hepatomas šūnās no solamargīna var novērot hromatīna sablīvējumu, DNS fragmentāciju un papildus G₁ pīķi DNS histogrammā, kas izraisa šūnu bojāeju apoptozes rezultātā (Korpan et al., 2004). Solamargīns uzrāda augstu citotoksicitāti cilvēka plaušu, prostatas un krūts vēža šūnās. Glikoalkaloīdi solamargīns un solasonīns, kas izolēti no *Solanum sodomaeum*, tiek izmantoti ļaundabīgu ādas audzēju ārstēšanā, ieskaitot bazālo un zvīņaino šūnu karcinomas (Lee et al., 2004). Solamargīns inaktivē arī dažādu vīrusu darbību. Pētījumos ir pierādīts, ka pacienti, kas inficēti ar *Herpes simplex* vīrusu, *Herpes zoster* vīrusu jeb jostas rozi vai *Herpes* ģenitāliju vīrusu, lokāli lietojot krēmu, kura sastāvā ir solamargīns, tika izārstēti pēc 3 – 10 dienām (Korpan et al., 2004).

Pārbaudot solasonīna, izolēta no *Solanum critinum*, un solasodīna, izolēta no *Solanum jabrense*, aktivitāti pret Ērliha karcinomas šūnām un cilvēka K562 leukēmijas

šūnām, atklāja, ka *in vitro* šie savienojumi izraisa no devas atkarīgu vēža šūnu augšanas inhibēšanu (Esteves–Souza, 2002).

Solamargīns un solasonīns apvienoti vienā zāļu formā tiek izmēģināti klīnikā dažādu vēžu tipu ārstēšanā: daudzveidīgās glioblastomas, cistas un metastezējušās plaušu melanomas ārstēšanā. Pielietojot šos glikoalkaloīdus, novēro daudzsološus rezultātus: audzēja izmēra samazināšanos, augšanas ātruma samazināšanos un pacientu dzīvildzes pagarināšanu (Esteves–Souza, 2002).

2.6. Gammaaminosviestskābe (GASS) augos

Ilgu laiku GASS augos tika uzskatīta tikai par stresa laikā radušos metabolītu (Bouche and Fromn, 2004; Kinnersley and Turano, 2000) un tās loma augos tālāk netika pētīta. Augiem stresu rada aukstums, karstums, sāļi, saspiešana, vējš, lietus u.c. Tad ātri pieaug intracelulārais Ca^{2+} līmenis, kas tālāk stimulē kalmodulīnkarīgās glutamātdēkarboksilāzes aktivitāti un GASS sintēzi. Pēdējā laikā uzskata, ka GASS ir arī signālmolekula augos un sadarbojas ar augu hormoniem. GASS līmenis pieaug augu augšanas un slimību laikā. Augiem nav tādu GASS receptoru kā zīdītājiem, uz kuriem GASS varētu darboties, bet atklāti proteīni, kuru struktūra atgādina cilvēku jonotropos glutamātreceptorus (Lacombe et al., 2001). Dzīvnieku un cilvēku GASS receptoru agonisti un antagonisti uz augu glutamātreceptoriem darbojas pretēji, tā pierādot GASS mediatora lomu augos. Piemēram, GASS receptoru agonists baklofēns stimulēja augu augšanu, bet antagonisti bikukulīns un pikrotoksīns traucēja (Bouche and Fromn, 2004). Tāpēc šodien uzskata, ka GASS augos ir gan metabolīta, gan signālpārneses molekulas loma. Kā signālpārneses molekula GASS stimulē augu augšanu (Bouche and Fromn, 2004).

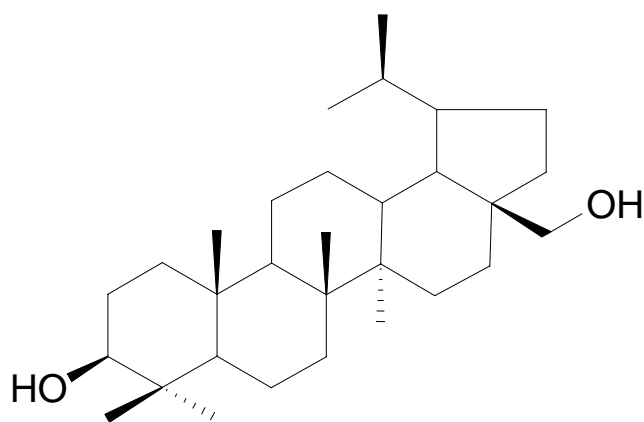
2.7. Lupāna rindas triterpēni: betulīns, betulīnskābe, lupeols

Pentacikliskie triterpēni ir plaši izplatīti augos un tiem ir liela loma dažādās tautsaimniecības nozarēs. Šodien ir izolēti apmēram 4000 triterpēnu.

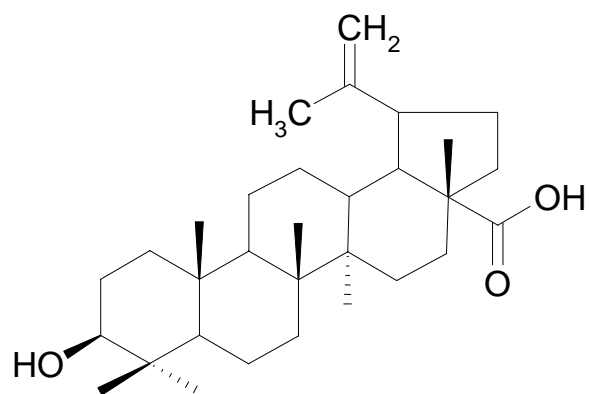
Betulīns bija viens no pirmajiem terpēniem, kuru 1788.g. Lovics (*Lowitz*) ar līdzautoriem izolēja no bērzu tās, tomēr ķīmisko struktūru precīzi noteica tikai 1952.gadā. Mūsdienās betulīns ir atklāts arī citos augos, tomēr bērza tāsīs tā saturs ir visaugstākais 10-30% un tieši betulīns nosaka bērzu tās virsējās daļas balto krāsu.

Somijā no koksnes pārstrādes atkritumiem gadā iegūst 200000 tonnu 95% betulīna. Betulīnu sakausējot kopā ar polimēriem iegūst jaunas plastmasas (Patočka, 2003; Alakurtti et al., 2006), bet galvenais betulīna pielietojums ir kosmētikā.

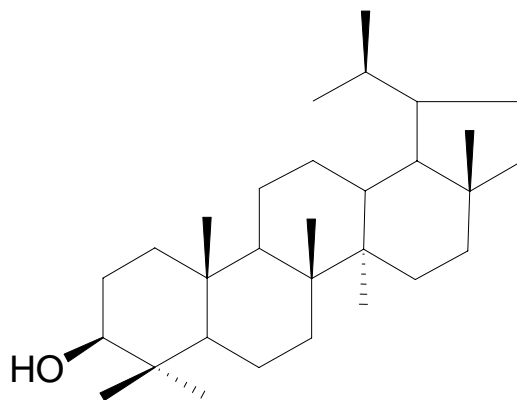
Pentacikliskajiem triterpēniem struktūrā ir lupāna uzbūve – viens sešlocekļu gredzens un otrs pieclocēkļu gredzens (6.att.).



BETULIN



BETULINIC ACID



LUPEOL

6.att. Lupāna rindas triterpēnu struktūra

Betulīnskābe dabā ir mazākos daudzumos, bērza tāsī apmēram 2%, bet lupeols ir atrasts ļoti mazos daudzumos (Alakurtti et al., 2006). Visiem lupāna atvasinājumiem ir atklāta pretiekaisuma (Zdzisinska et al., 2003; Yamashita et al., 2002), pretvīrusu un pretvēža darbība (Gong et al., 2005; San et al., 1998), bet betulīnskābei ir patentēta arī anksiolītiska iedarbība (Durst et al., 2002). Triterpēni ir lipofīlas molekulas un spēj šķērsot smadzeņu–asinsvadu barjeru. Anksiolītiskā darbība novērota pēc *per os* un intraperitoneālas (i.p.) betulīnskābes ievadīšanas pelēm un žurkām (Udeani et al., 1999). Betulīnskābes farmakokinētikas mērījumi liecina par ātru absorbciju pēc i.p. injekcijas (Udeani et al., 1999). Kaut gan dabā betulīnskābes ir maz, to samērā viegli var sintezēt no betulīna.

Pēdējos gados pieaugošā melanomas statistika veicinājusi antimelanomas līdzekļu meklējumus augu vidū. Pētot betulīnskābes un betulīna darbības molekulāros mehānismus, atklāja to spēju aktivēt mitogēnaktivēto kināžu kaskādi (Tan et al., 2003), inhibēt fosfolipāzi A2 (Bernard et al., 2001) un modulēt interleikīna 10 (IL-10), tumornekrozes faktora un gamma interferona producēšanos (Zdzisinska et al., 2003). Betulīnam atklāja spēju inhibēt superoksīda rašanos, nobloķējot tirozīna fosforilēšanos 45 kDa proteīna molekulā, kas atrasts cilvēka neitrofilajās šūnās (Yamashita et al., 2002). Tomēr pretvēža darbības molekulāros mehānismus šie dati neizskaidro. Betulīnskābei tika atklāta selektīva spēja nonāvēt ādas vēža (melanomas) un neuroblastomas šūnas, kā arī atrasta spēcīga antimelanomas darbība bez izteiktas *in vivo* toksicitātes pelēm (Pisha et al., 1995; Schmidt et al., 1997; Selzer et al., 2000). Pēdējos

gados tiek publicētas arvien jaunas no betulīna vai betulīnskābes molekulas atvasinātu sintētisku vielu struktūras ar citotoksisku iedarbību (Santos et al., 2009; Santos et al., 2010).

Betulīnam un tā analogiem atrasta pretsēņu darbība dažādās sēņu kultūrās, bet efektīvā koncentrācija (EC_{50}) ir no 15 līdz 50 μM robežās (Jasicka-Misiak et al., 2010).

Tomēr betulīna un betulīnskābes pretvīrusu darbībai ir pievērsta vislielākā uzmanība (Yu et al., 2007; Aiken and Chen, 2005; Patočka, 2003), jo atklāja, ka betulīna diacetāts inhibē cilvēku imūndeficīta pirmā tipa vīrusa reverso transkriptāzi ar IC_{50} 1.4 μM koncentrācijā (Akihisa et al., 2001). Vēlāk tika sintezēti daudzi betulīna analogi, bet izrādījās, ka betulīnskābe ir aktīvāka un tagad meklē jaunus betulīnskābes analogus ar vēl spēcīgāku anti-HIV darbību (San et al., 1998). Bet nesen sintezēti savienojumi, kas uzrāda anti-HIV efektu pat nanomolārā koncentrācijā (Alakurtti et al., 2006).

Dodot betulīnu kopā ar aknu šūnas aizsargājošām vielām, novēroja, ka ar gamma stariem apstaroti eksperimentālie dzīvnieki izdzīvo ilgāk kā kontroles dzīvnieki, kas saņēma tikai aknu protektorus. Līdzīgi betulīns pastiprina pretvīrusu (pret *Herpes simplex*) preparātu darbību (Gong et al., 2005).

3. MATERIĀLI UN METODES

3.1. Reāģenti

Visus reāģentus, izņemot pētāmos peptīdus un šūnu audzēšanas barotnes, pirkām no *Sigma/Aldrich Chemical Co* (St. Louis, MO, ASV) pārstāvniecības Latvijā *Labochema*. Radioaktīvie ligandi [¹²⁵J]-NDP-MSH, [³H]GASS (92 Ci/mmol) un [³H]flunitrazepams (91 Ci/mmol) tika saņemti no *Amersham Bioscience* (Upsala, Zviedrija). Visus šūnu audzēšanai nepieciešamos reāģentus un barotnes pirkām no *Life Technologies*, Zviedrijā. Peptīdus pirkām no *NeoMPS* (Strasbūra, Francija).

3.2. Pētāmās vielas

Betulīnu, betulīnskābi, lupeolu, α -solanīnu un α -hakonīnu pirkām no *Sigma/Aldrich* pārstāvniecības Latvijā *Labochema*. Betulīns, betulīnskābe un lupeols ūdenī nešķīst, tāpēc *in vitro* eksperimentos tos šķīdinājām dimetilsulfoksīdā (DMSO), lai pagatavotu 10 mM koncentrātu, kuru pēc tam atšķaidījām ar atbilstošu eksperimentiem buferi. *In vivo* eksperimentiem triterpēnus suspendējām fizioloģiskajā NaCl šķīdumā ar 0,5% Tween-80 palīdzību. α -Solanīnu un α -hakonīnu šķīdinājām paskābinātā destilētā ūdenī un nolīdzsvarojam pH līdz 7,4 ar 5 N NaOH šķīdumu. Melanokortīnu peptīdu (α -melanocītstimulējošais hormons (α -MSH)) šķīdinājām 0,9% NaCl šķīdumā, šķīdumus alikvotējām un līdz eksperimentam uzglabājām saldētavā – 20°C temperatūrā. Ja peptīdu šķīdumi netiek atkārtoti atsaldēti un sasaldēti, tie saglabājas stabili. Eksperimentos atšķaidījumi tika veikti ar metodei atbilstošu buferšķīdumu.

Kartupeļu pētījumos izmantojām dažādas šķirnes kartupeļus un dažādus ekstraktu iegūšanas veidus. Radioligandu saistīšanās eksperimentos izmantojām kartupeļu sulu. Aktīvo vielu diazepama, GASS un glikoalkaloīdu noteikšanai gan sulu, gan kartupeļu masas ekstraktus.

Radioligandu saistīšanās eksperimentos izmantojām „Adretta” šķirnes kartupeļus, ko audzēja bioloģiskajā zemnieku saimniecībā un novāca no lauka 2005. un 2006. gada rudenī. Citos eksperimentos izmantojām dažādu šķirņu kartupeļus.

Kartupeļus uzglabāja tumšā vietā, 10°C temperatūrā telpā ar relatīvo mitrumu 50%. Kartupeļus nomizojām un izspiedām sulu. Sulu izfiltrējām caur nitrocelulozes filtru ar 0,5 µm porām un nocentrifugējām ar 12000 apgr./min. 5 min. Izmantojām supernatantu, kuram ar 2 M NaOH palīdzību panācām pH 7,4. Eksperimentos izmantojām svaigi spiestu sulu, kuru atšķaidījām ar saistīšanās eksperimentos lietoto buferi.

Augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas (AEŠH) metodē izmantojām dažādu kartupeļu šķirņu ekstraktus, kurus ieguvām, homogenizējot kartupeļus ar mizu vai nomizotus kartupeļus ar paskābinātu ūdeni. Kartupeļi bez mizas (apmēram 15–25 grami, precīzs iesvars) tika sagriezti nelielos gabalos un sablenderēti kopā ar 100 ml 5% etiķskābes (CH₃COOH) šķīdumu līdz viendabīgai masai. No sablenderēto kartupeļu šķīduma paņēma masas šķidro daļu un pārnesa citā traukā uz nostādināšanu. Pēc nostādināšanas paņēma augšējo šķīduma slāni un filtrēja ar 0,45 µm lielu poru filtru. Nofiltrēto šķīdumu atdalīja ar CFE metodi.

3.3. Šūnu līnijas

Šūnu līnijas nopirkām no ATCC šūnu bankas ASV, kur šūnas ir reģistrētas ar kodiem: COS-7 – ATCC CRL-1651 un B16-F1 – ATCC CRL-6323.

3.4. Šūnu kultūras

Visus šūnu audzēšanai nepieciešamos reaģentus un barotnes pirkām no *Life Technologies*, Zviedrija. Katru šūnu līniju kultivējām barotnēs saskaņā ar šūnu līniju sertifikātu. COS-7 un B16-F1 šūnu kultivēšanai izmantojām Dulbecco's barotni ar 10% liellopu embrija seruma piedevu (FBS) un antibiotikām 1% penicilīns/streptomicīns, pretsēņu preparātu – 0,5% amfotericīnu.

Šūnas audzējām šūnu inkubatorā 37°C temperatūrā, 5% CO₂ atmosfērā, līdz tās par 80% aizpildīja audzēšanas plates (parasti sterilās T25 vai T75). Tad šūnas tripsinizējām ar 0,25% tripsīna/EDTA šķīdumu, ar pipeti savācām centrifugēšanas stobriņos un centrifugējām istabas temperatūrā ar 2000 apgr./min. 5 min. Pēc centrifugēšanas virsējo slāni nolējām un nogulsņējušās šūnas resuspendējām barotnē vai eksperimentam piemērotā buferšķīdumā un saskaitījām. Šūnu skaitīšanai izmantojām mikroskopu un hematocitometru.

B16-F1 šūnas dabīgi ekspresē melanokortīnu receptoru pirmo apakštipu, tāpēc tās tūlīt pēc konfluences (vismaz 80% plates aizpildījums) sasniegšanas izmantojām attiecīgajiem eksperimentiem.

3.5. Tripsinizēšana un šūnu skaitīšana

Tripsīna šķīdumu pievienojām šūnu kultūrām pēc barotnes noliešanas ar aprēķinu 75 cm² traukam – 2,5-5 ml, 150 cm² – 5-10 ml. Tripsīns izraisa šūnu disociāciju no plates plastmasas, un šūnas var savākt ar pipeti no audzēšanas platēm un centrifūgas stobriņos nocentrifugēt. Tripsīna inaktivācijai pievienojām FBS vai tripsīna inhibitora šķīdumu 1:1.

Šūnu skaitu 1 ml suspensijas noteicām ar hematocitometru.

3.6. Dzīvo šūnu skaita noteikšana

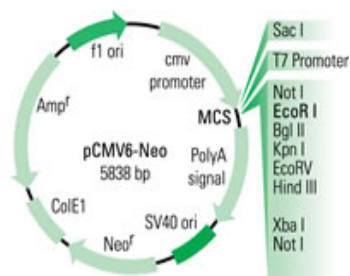
Lai atšķirtu dzīvas šūnas no mirušām, izmantojām krāsvielu tripānzilo. Krāsviela iekrāso mirušās šūnas, kuru raksturīga pazīme ir ļaut krāsvielai caur membrānu ieplūst šūnā. Šūnu suspensijas 10 µl pievieno 10 µl tripānzilā šķīduma un raugoties mikroskopā hematocitometra lauciņos saskaita dzīvās šūnas. Aprēķinos ņem vērā atšķaidījumu.

3.7. Šūnu transfektēšana

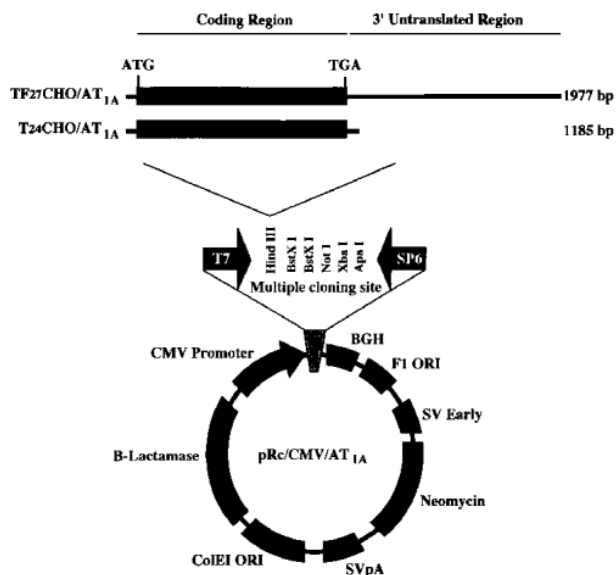
COS-7 šūnas neekspresē melanokortīnu receptorus (MKR), tāpēc tās transfektējām ar pētāmo receptoru cDNS konstruktiem ekspresijas vektoros. Ependorfa mēģenē ielējām 70 µl OptiMEM barotnes, pievienojām 20 µl Lipofectin reaģenta un apmēram 1 µg katra melanokortīnu receptora apakštipa plazmīdu DNS uz 1 miljonu šūnu. Inkubējām apmēram 1 min istabas temperatūrā. Tad COS-7 šūnu monoslānim nolējām audzēšanas barotni un pilinot pievienojām sagatavoto OptiMEM barotni. Inkubējām šūnu inkubatorā 12 stundas. Tad nomainījām OptiMEM uz parasto šūnu audzēšanas barotni un audzējām šūnas CO₂ inkubatorā 48 stundas. Pēc tam šūnas tripsinizējām un saskaitījām.

3.7.1. Melanokortīnu receptoru apakštipu DNS konstrukti

Melanokortīnu receptoru 1. un 5. apakštipu (MKR1 un MKR5) proteīnam atbilstošās DNS klonētas pRc/CMV ekspresijas vektorā (Invitrogen), bet 3. un 4. apakštipa (MKR3 un MKR4) atbilstošās DNS ir klonētas pCMV/neo ekspresijas vektorā (saņemti kā dāvana no prof. Ira Gantz, Mičiganas universitātē).



7. att. pCMV/neo vektors (Origene katalogs)



8. att. pRc/CMV ekspresijas vektora struktūra (Invitrogen katalogs)

3.8. Ligandu - receptoru saistīšanās noteikšana

3.8.1. Melanokortīnu ligandu receptoru saistīšanās noteikšana

Radioligandu receptoru saistīšanās noteikšanu veicām, izmantojot šūnu monoslāni 96 lauciņu platēs, kā aprakstīts *Schioth et al.*, 1995. Šūnas sadalījām pa 100000 katrā lauciņā 50 µl-os buferšķīduma, kas bija pagatavots no MEM (*Minimum essential medium*) ar 0,2% liellopu seruma albumīnu, 1 mM 1,10-fenantroīna, 0,5 mg/l leupeptīna, 200 mg/l bacitracīna un 25 mM HEPES piedevām, pH=7,4.

Šūnas inkubējām ar iezīmēto ligandu [¹²⁵J]-NDP-MSH 0,2 nM koncentrācijā, bet pētāmās vielas tika pievienotas dažādās koncentrācijās.

Pēc iezīmētā liganda un pētāmo vielu pievienošanas šūnas inkubējām 2 stundas CO₂ inkubatorā. Pēc inkubācijas šūnas tika noskalotas 2 reizes ar ledus aukstu buferi un izšķīdinātas 0,1 M NaOH šķīdumā. Izšķīdināto šūnu radioaktivitāte tika skaitīta ar 1450 Microbeta Trilux *Wallac-Wizard* skaitītāju, un iegūtie dati analizēti ar datorprogrammu *GraphPad Prism*. Eksperimenti tika veikti ar 2–3 paralēliem mērījumiem un atkārtoti 3–4 reizes.

3.8.2. Ligandu saistīšanās pie benzodiazepīnu saistīšanās vietas uz GASS_A receptoriem

Smadzeņu audus sagatavojām pēc iepriekš publicētām metodēm (Cope et al., 2004; Klusa et al., 1990). ICA peļu tēviņu smadzenes homogenizējām ar ledus aukstu 50 mM Tris/HCl buferi, pH 7,4 tilpuma un audu attiecībā 1:32. Homogenātus centrifugējām 150000 x g 15 min. un nogulsnes sasaldējām –20°C 30 min. Tad resuspendējām atkal Tris/HCl buferī un atkārtoti centrifugējām. Šo procedūru atkārtojām trīs reizes. Pēc tam nogulsnes resuspendējām buferī ar tādu aprēķinu, lai proteīnu koncentrācija būtu 0,5–0,7 mg/ml. Proteīnu koncentrāciju noteicām ar Bradforda metodi (Bradford, 1976), izmantojot liellopu seruma albumīnu kā standartu. Membrānas sasaldējām –80°C un uzglabājām līdz eksperimentu veikšanai.

Radioligandu konkurences saistīšanās testā izmantojām konstantu [³H]flunitrazepāma 3 nM koncentrāciju un dažādas pētāmo vielu koncentrācijas un inkubējām 60 min. 4°C 96 lauciņu *MultiScreen* mikroplatēs. Nespecifisko saistīšanos noteicām ar 100 µM diazepāma. Pēc inkubēšanas suspensiju filtrējām caur Vatmanfiltru

(GF/B). Pēc tam filtrus šķīdinājām šķidrums scincilācijas kokteili *OptiPhase*. Filtriem piesaistīto radioaktivitāti mērījām 1 min ar scincilācijas un luminiscences mērīšanas aparātu 1450 *Microbeta Trilux* (Wallac, Somija).

3.8.3. Ligandu saistīšanās pie GASS saistīšanās vietas GASS_A receptora molekulā

Smadzeņu membrānas sagatavojām pēc iepriekš publicētas metodes (Mehta and Ticku, 2001). Peļu smadzenes homogenizējām ledus aukstā 0,32 M saharozes buferī, pH 7,4 attiecībā 20 ml/g audu. Tad homogenātu centrifugējām 140000 x g 30 min. 4⁰C, lai iegūtu mitohondriālo un mikrosomālo frakciju. Pēc centrifugēšanas nogulsnes resuspendējām dejonizētā, destilētā ūdenī un atkal homogenizējām un centrifugējām. Tad nogulsnes resuspendējām 50 mM Tris/HCl buferī un centrifugējām atkal. Šo procedūru atkārtojām trīs reizes. Tad nogulsnes mazā bufera tilpumā sasaldējām -20°C un uzglabājām 12 h. Pēc tam atkausējām, resuspendējām 20 ml/g audu 50 mM Tris/HCL buferī un centrifugējām 140000 x g 30 min. Šo procedūru atkārtojām divas reizes. Tad nogulsnes resuspendējām buferī ar aprēķinu, lai proteīnu koncentrācija būtu 0,5–0,7 mg/ml.

Ligandu saistīšanās konkurences eksperimentos membrānas inkubējām 60 min ar konstantu 10 nM [³H]GASS koncentrāciju un dažādām neiezīmēto vielu koncentrācijām buferī 50 mM Tris/HCl ar 50 mM KCl (pH 7,4) temperatūrā 4⁰C.

Nespecifisko saistīšanos noteicām ar 100 μM GASS koncentrāciju.

Pēc inkubēšanas suspensiju filtrējām caur Vatmanfiltru (GF/B). Pēc tam filtrus šķīdinājām šķidrums scincilācijas kokteili *OptiPhase*. Filtriem piesaistīto radioaktivitāti mērījām 1 min ar scincilācijas un luminiscences mērīšanas aparātu 1450 *Microbeta Trilux* (Wallac, Somija).

3.9. cAMF producēšanās mērījumi

B16-F1 un COS-7 šūnas pēc transfektēšanas ar melanokortīnu receptoru cDNS pēc tripsinizēšanas un centrifugēšanas inkubējām 30 min 37⁰C ūdens vannā DMEM barotnē bez FBS, pievienojot 0,5 mM 3-izobutil-1-metilksantīnu (IBMX), lai inhibētu fosfodiesterāzes aktivitāti un saglabātos sintezējusies cAMF. Pēc šīs apstrādes šūnas sadalījām pa 50000 katrā 96 lauciņu plates lauciņā. Barotni nocentrifugējām 1500 apgr./min. 5 min un nolējām, bet šūnu monoslānim pievienojām 0,05 ml

DMEM+IBMX, kurā bija izšķīdinātas pētāmās vielas dažādās koncentrācijās. Šūnas inkubējām 20 min šūnu inkubatorā, tad nocentrifugējām, un cAMF ekstrahējām ar 4,4 M HClO₄. Pēc 5 min skābi neitralizējām ar 5 M KOH/1 M TRIS buferi un centrifugējām. cAMF koncentrāciju šūnu lizātos mērījām ar cAMF proteīna saistīšanas metodi (Nordstedt and Fredholm, 1990). cAMF koncentrāciju paraugos izrēķinājām pēc cAMF standartlīknes, kuru ieguvām mērot zināmas koncentrācijas cAMF paraugus.

3.10. Diazepama un GASS līmeņu noteikšana kartupeļu ekstraktos ar AEŠH metodi

Izmantotā aparatūra, reāģenti un metodes apstākļi

- Hromatogrāfs *Waters 2690 Alliance*;
- *Shimadzu LC201 D Binary HPLC* pumpis
- Fotodiožu matricas detektors 996;
- Datu apstrādes sistēma – *MasLynx*;
- Automātiskā paraugu injicēšanas iekārta;
- Apgrieztās fāzes *Waters Spherisorb[®] 5 μm NH₂ 4,6x250 mm* vielu izdalīšanas kolonna;
- pH metrs
- Analītiskie svāri *PRECISA XB 220A* (± 0,0001g);
- Membrānfiltri kustīgās fāzes filtrēšanai *SARTORIUS 0,45 μm*;
- Kustīgās fāzes filtrēšanas iekārta *MILLIPORE* saistīta ar *AIR ADMIRALTM* vakuumsūkni;

Diazepama hromatogrāfija

Mobilā fāze bija acetonitrils (A) un ūdens (B): 0–5 min, 20% A; 5–15 min –20–25% A; 15–30 min, 25–30% A, pēc 30 min 100% A, plūsmas ātrums 0,8 ml/min, monitorēšanas viļņi 235 nm.

Diazepamu identificējām hromatogrammā pēc standarta spektra un pīķa parādīšanās laika. Diazepama standartlīkni uzņēmām koncentrāciju diapazonā no 0,5 līdz 8 μg/ml.

15 g kartupeļu ekstrahējām 15 min trīs reizes ar 25, 10 un 10 ml n–heksāna/etilacetāta/trihlormetāna maisījuma proporcijās 65:30:5 un 3 reizes sonificējām pa 15 min istabas temperatūrā. Trīs reižu ekstrakcija bija pietiekoša, lai izekstrahētu 99,8% diazepāma. Totālais ekstrakta tilpums (45 ml) tika centrifugēts 5 min pie 4000

apgr./min. Augšējo organisko slāni savācām koniskā kolbā un iztvaicējam slāpekļa plūsmā ūdens vannā 40 °C temperatūrā. Sauso atlikumu šķīdinājam 1 ml acetonitrila/ūdens maisījumā (3:7 v/v), centrifugējam un supernatantu injicējam AEŠH koloniņā.

GASS hromatogrāfija

AEŠH metodes validācijai un standartlīknes iegūšanai GASS standarti dažādās koncentrācijās tika izmantoti kā ūdens metanola šķīdumi. GASS neizmainītā veidā ar UV detektoru nevar noteikt, tāpēc jāizmanto tās ķīmiskie derivāti. Dansilderivatizāciju veicām pēc iepriekš publicētas metodes (Kang et al., 2006), sagatavojot dansilreaģenta šķīdumu acetonitrilā. Mobilā fāze bija 35:65 metanols/ūdenī (v/v) ar 1,5% trietilamonija un 5 mM/l tetrabutilamonija hidroksīda piedevu, pH 2,5. GASS standartam vai kartupeļu sulai 20 µl tilpumā pievienojām 50 µl 2 M KCO₃-KOH šķīduma, pH 9,8 un 50 µl dansilreaģenta šķīduma acetonitrilā. Mēģeni spēcīgi maisījām 5 s tumšā vietā, tad sildījām 30 min ūdens vannā 80°C. Pēc sildīšanas pievienojām 20 µl etiķskābes, lai apturētu reakciju. Maisījumu centrifugējam 10000 x g 5 min. Supernatanta 20 µl injicējam AEŠH sistēmā ar diožu rindas detektoru, izmantojam koloniņu ar parametriem: c18, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm. Mērījumus veicām istabas temperatūrā pie 286 nm viļņu garuma.

3.11. Diazepama identifikācija ar gāzu hromatogrāfu

Izmantojam Shimadzu GC-2010 gāzu hromatogrāfu un temperatūras režīmu: 1 min 100°C, tad ar ātrumu 25 grādi/min temperatūru paaugstinājam līdz 310 °C uz 4 min. Iesmidzes temperatūra bija 300 °C.

Injicējam 1 µl diazepama šķīduma, par nesējgāzi lietojot hēliju ar plūsmas ātrumu 0,94 ml/min. Masspektrometra (MS) darbības apstākļi bija: elektronu jonizācija ar 70 eV elektronu enerģiju, jonu avota temperatūra bija 230°C, GC-MS temperatūra (*interface*) 280°C, kvadrupla (*Quadruple*) moduļa temperatūra – 150°C. Šķīdinātāja izplūdes laika nobīde bija 4 min. Izvēlējamies SIM reģistrācijas veidu un monitorējam masspektus izvēlētiem joniem: 165, 256, 283 un 284.

3.12. Glikoalkaloīdu līmeņu mērījumi kartupeļos ar AEŠH metodi

Metodes validācijai tika izmantoti reaģenti un palīgvielas:

- H_2O - dejonizēts ūdens, (Millipore MilliQ-plus);
- HCl - sālsskābe, (Riedel-de-Haën);
- CH_3CN – acetonitrils (Fluka / Aldrich);
- KH_2PO_4 - kālija dihidrogenfosfāts, buferviela (Fluka / Aldrich);
- Analizējamās standartvielas – α -solanīns un α -hakonīns (Sigma /Aldrich, Labochema Latvia);

Visas analīzes tika veiktas ar AEŠH iekārtu *Waters 2690 Alliance*, ar fotodiožu matricas detektoru 996, kolonnas un paraugu termostatu, nepārtrauktu kustīgās fāzes degazēšanas iekārtu, automātisko paraugu injicēšanas iekārtu un *MasLynx* datu apstrādes sistēmu. Izmantojām apgriestās fāzes *Waters Spherisorb[®] 5 μ m NH_2 4.6x250 mm* vielu izdalīšanas koloniņu, kustīgās fāzes filtrēšanas iekārtu *MILLIPORE* saistītu ar *AIR ADMIRALTM* vakuumsūkni, kustīgās fāzes filtrēšanai *SARTORIUS 0,45 μ m* membrānfiltrus.

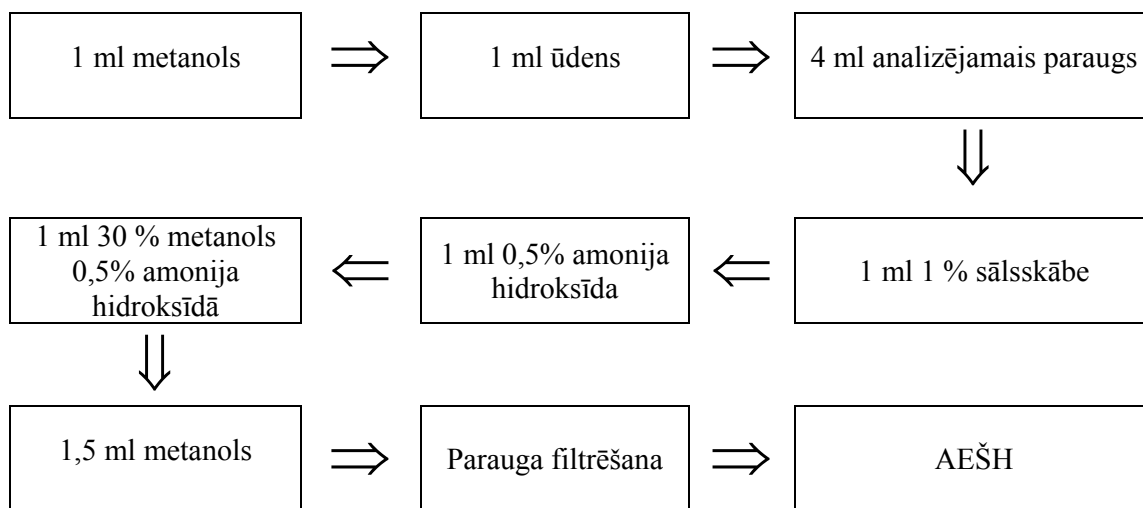
Nosvērām 3,3 mg α -hakonīna un 2,4 mg α -solanīna, izšķīdinājām 10 ml 1% HCl, iegūstot kopējo standartšķīdumu ar koncentrācijām attiecīgi 0,33 mg/ml un 0,24 mg/ml.

AEŠH apstākļi. Izmantojām 75% organiskā modifikatora koncentrāciju, par kustīgo fāzi (pH 6) lietojot acetonitrila ūdens buferšķīdumus (20 mM KH_2PO_4). Par sorbentu izmantojām apgriestās fāzes *Waters Spherisorb[®] 5 μ m NH_2 4,6x250 mm* vielu izdalīšanas koloniņu. Standartšķīdumus injicējam 50 μ l tilpumā. Vielu sadalīšanas kolonnas temperatūra bija 40°C.

Glikoalkaloīdi: α -hakonīns un α -solanīns tika izdalīti ar cietfāzes ekstrakcijas (CFE) metodi (angļu valodā - solid phase extraction (SPE)).

Vispirms CME kasetnes (*Waters, Oasis[®]HLB 3cc*) izskalojām ar metanolu un ūdeni. Tad ievadījām analizējamo standartvielu paraugu, izskalojām liekos savienojumus sākumā ar stipri skābu, tad bāzisku vidi un visbeidzot ar metanolu

iegūvām vajadzīgo frakciju analīzēm. Metanola slāni nofiltrējām ar 0,20 µm poru filtru un analizējām ar AEŠH metodi.



9. att.. Glikoalkaloīdu izdalīšanas secība, izmantojot CME

Eksperimentiem ņēmām kartupeļus ar un bez mizas. Nosvērām apmēram precīzi 25 gramus svaigu kartupeļu, sagriezām nelielos gabaliņos, ievietojām blenderī un pielējam klāt 100 ml 5% CH₃COOH šķīdumu, tad blenderi ieslēdzām un uz vidēji liela ātruma atstājam maisīties apmēram 10 min. Tad iegūto sulu bez putām pārlējam citā traukā un centrifugējam. Pēc centrifugēšanas ņēmām augšējo šķīduma slāni un filtrējam ar 0,45 µm lielu poru filtru. Šo nofiltrēto šķīdumu tālāk atdalījam pēc minētās shēmas (9.att.). Savākto glikoalkaloīdu slāni pirms ievadīšanas hromatogrāfā filtrējam, lietojot 0,20 µm poru filtru.

3.13. Polifenolu satura noteikšana

Polifenolu satura noteikšanai izmantojam Folīna – Čikalteu metodi (Singleton et al., 1999). Kopējo polifenolu daudzumu nosaka kompleksa veidošanās reakcijā ar fosfortannāta reaģentu vāji bāziskā vidē. Šis reaģents stehiometriski reaģē ar jebkura tipa fenolgredzēniem. 1 ml standarta Folīna – Čikalteu reaģents (*Merck*) tika atšķaidīts ar destilētu ūdeni attiecībās 1:10. Nātrija karbonāta (*Reachem*) 7,5% šķīdumu pagatavojām, nosverot 7,50 g Na₂CO₃ un atšķaidot ar destilēto ūdeni līdz 100 ml.

Kā standartvielu lietojām galluskābi (*Sigma*). Kalibrācijas līknes iegūšanai pagatavojām galluskābes 0,175; 0,14; 0,0875; 0,035; 0,0175 mg/ml standartšķīdumus dejonizētā ūdenī. Pie 0,5 ml galluskābes standartšķīduma pievienojām 2,5 ml svaigi pagatavotā Folīna – Čikalteu reagenta un 2 ml 7,5% nātrija karbonāta šķīduma.

Absorbciņu mērījām pēc 30 minūtēm (25°C) pie 765 nm (spektrofotometrs *Spectronic 20D+*, *Milton Ray*, *ASV*). Kontrolei galluskābes vietā ņēmām destilēto ūdeni.

Polifenolu noteikšanai augu ekstraktos galluskābes vietā ņēmām 0,5 ml ekstrakta. Kopējo polifenolu saturu galluskābes ekvivalentos (GSE) ekstraktā aprēķinājām pēc formulas:

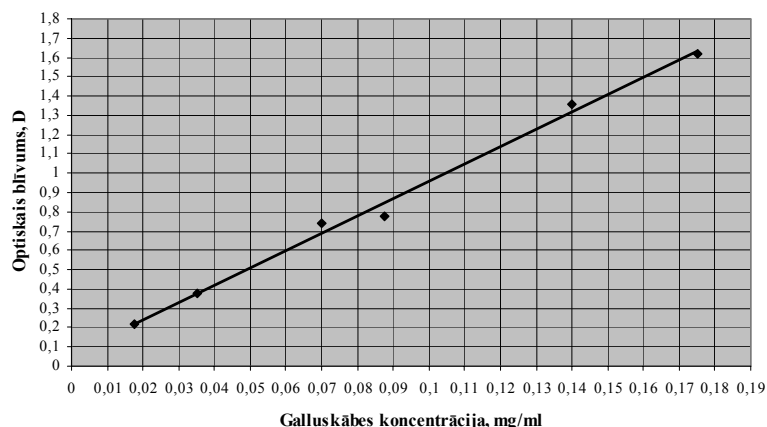
$$C = n \cdot c \cdot V, \text{ kur}$$

n – atšķaidīšanas faktors

V – ekstrakta tilpums

c – galluskābes daudzums, ko nosaka pēc kalibrēšanas līknes, mg/ml.

Kalibrēšanas līkne polifenolu noteikšanai



10. att. Galluskābes standartlīkne

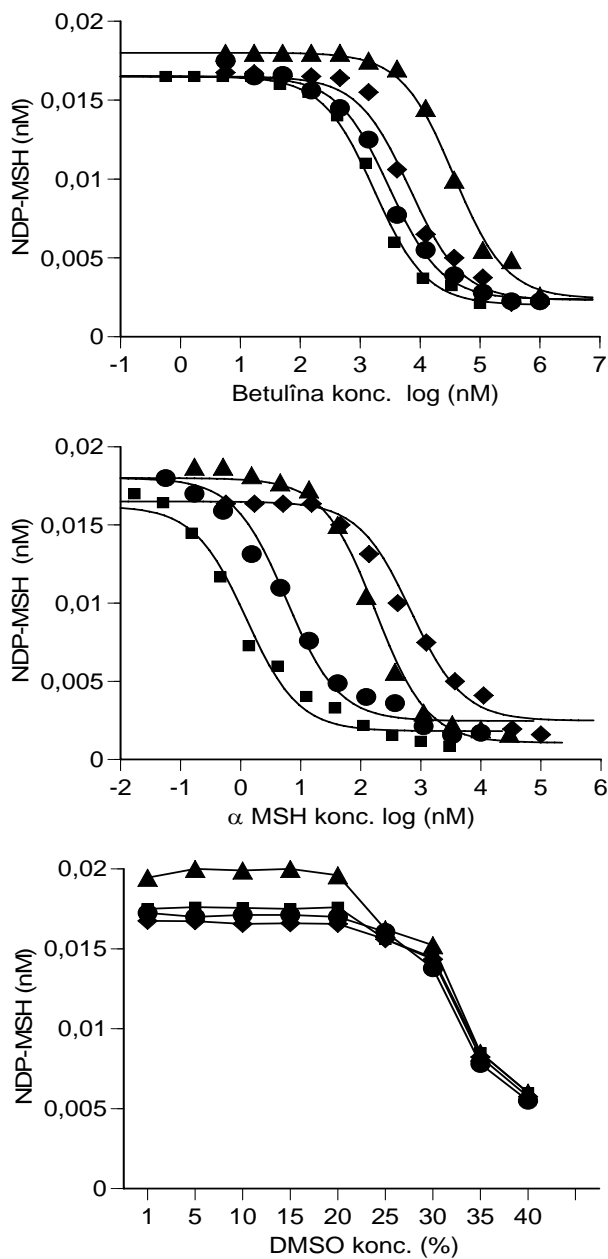
3.14. Datu apstrāde

Datu apkopošanā un statistiskajā analīzē tika izmantotas programmas *Microsoft Excel 2000 for Windows* un *GraphPad Prism 3,00*. Rezultātu ticamība noteikta ar (*one-way analysis of variance*) ANOVA un Bonferroni vai Dunneta testiem. Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja P vērtība līdzinās vai ir mazāka par 0,05.

4. REZULTĀTI

4.1. Betulīna saistīšanās pie melanokortīnu receptoriem

Radioligandu konkurences līknes liecina par betulīna spēju saistīties pie melanokortīnu receptoru (MKR) apakštipiem 1,3, 4 un 5.



11. att. Betulīna, α -MSH un DMSO konkurence ar iezīmēto NDP-MSH par saistīšanos pie MKR. Kvadrāti – MKR1, apļi – MKR3, trīstūris – MKR4 un rombi – MKR5.

Betulīns izkonkurēja iezīmēto NDP–MSH no saistīšanās vietām uz visiem melanokortīnu receptoru apakštipiem. Betulīnskābe un lupeols nesaistījās pie receptoriem, jo nekonkurēja ar iezīmēto peptīdu NDP–MSH. Peptīdu α -MSH lietojām kā references ligandu ar zināmu afinitāti pret visiem MKR apakštipiem. Šī kontrole apliecināja arī veiksmīgu šūnu transfekciju ar MKR cDNS, jo neizmainītas COS–7 šūnas neekspresē melanokortīnu receptorus.

Triterpēni nešķīst ūdenī, tāpēc tie bija šķīdināti DMSO un pēc tam 10 mM koncentrētais šķīdums tika atšķaidīts ar eksperimentam piemērotu buferi. Pārbaudījām ar buferi atšķaidīta DMSO ietekmi uz receptoriem koncentrācijās no 1 līdz 40%. Izrādījās, ka DMSO vienādi traucē NDP–MSH saistīšanos pie visiem MKR apakštipiem. Selektivitāti nenovērojām. NDP–MSH saistīšanās samazinās DMSO klātbūtnē, sākot no 20% DMSO koncentrācijas. Betulīna saistīšanās eksperimentos DMSO koncentrācija nepārsniedza 10%, kas ir augstākā DMSO koncentrācija betulīna atšķaidījumos, tāpēc var uzskatīt, ka DMSO efekta nav un betulīns pats konkurē ar NDP–MSH par saistīšanos pie receptoriem. Novērojām, ka betulīns uzrādīja selektivitāti pret pirmo apakštipu. Tomēr afinitāte ir zema, jo betulīns saistās tikai μ M koncentrācijās ar afinitātes prioritāti: MKR1 > MKR3 > MKR5 > MKR4. Atklājām, ka betulīns saistās nedaudz līdzīgi MK peptīdu farmakoforam – sintētiskajam MSH vidus fragmentam ar aminoskābju secību HdFRWG (Schioth et al., 1997).

Tabula 5. Inhibīcijas konstantes (K_i) μ M koncentrācijās betulīnam un MSH peptīdiem

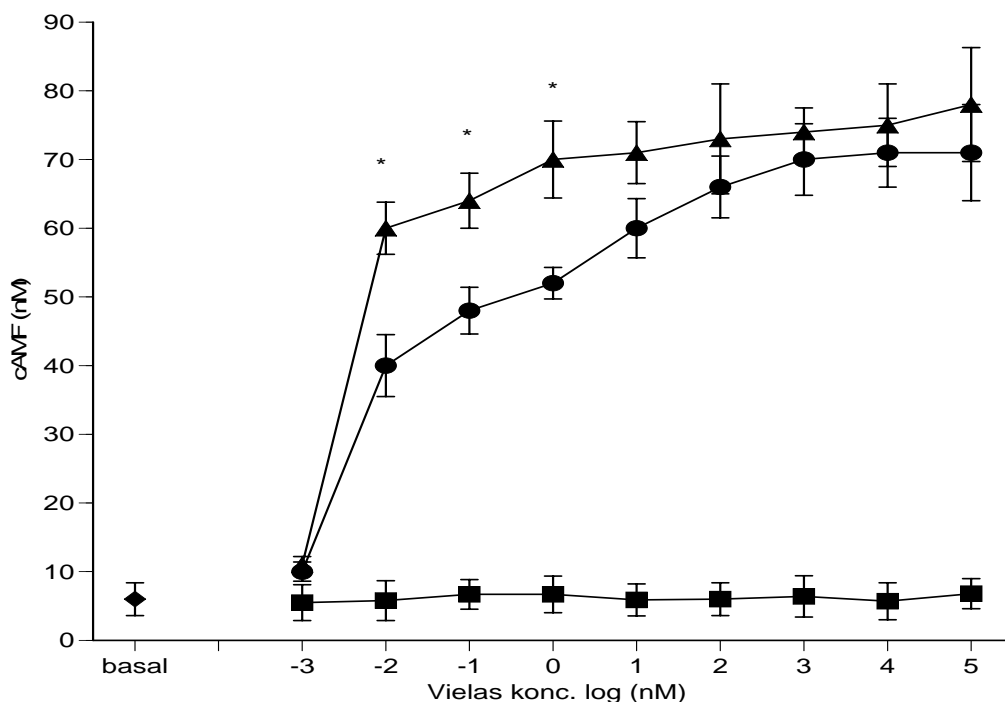
Ligands	MKR1	MKR3	MKR4	MKR5
Betulīns	1,02 \pm 0,12	5,96 \pm 0,31	26,02 \pm 0,71	17,5 \pm 0,3
α -MSH	0,000134 \pm 0,00002	0,0167 \pm 0,004	0,60 \pm 0,10	7,45 \pm 1,58
β -MSH	0,0012 \pm 0,00027	0,00367 \pm 0,000134	0,375 \pm 0,09	14,4 \pm 1,67
γ 1-MSH	0,00267 \pm 0,00035	0,0071 \pm 0,003	29 \pm 1,8	42,6 \pm 6,6
γ 2-MSH	0,011 \pm 0,0054	0,018 \pm 0,0019	>100	>100
HdFRWG	0,292 \pm 0,053	7,76 \pm 1,9	7,17 \pm 0,98	61,20 \pm 28

Eksperimentus veicām ar paraugu dublikātiem un atkārtojām trīs reizes. Rezultāti parādīti kā vidējais \pm S.D. (standartnovirze). MK peptīdu saistīšanās dati ņemti no publikācijas Schioth et al., 1996.

Kaut gan betulīna afinitāte ir daudz zemāka par dabīgo MSH peptīdu afinitāti, tomēr pie MKR5 betulīns saistās līdzīgi endogēnajiem MSH peptīdiem un pie MKR4 tā saistīšanās inhibīcijas konstante K_i ir tuvu γ 1-MSH saistīšanās K_i koncentrācijai.

4.2. Betulīna efekti uz cAMF producēšanos šūnās

Peļu melanomas šūnas B16–F1 ekspresē MKR1 un pēc tā stimulēšanas producē cAMF. Mēs stimulējām šīs šūnas un transfektētās COS–7 šūnas 20 min ar dažādām betulīna un α -MSH koncentrācijām. Nestimulētas šūnas kalpoja kā kontrole. Novērojām, ka B16–F1 nestimulētās šūnas producē apmēram 6–8 nM cAMF bazālā līmeņa. α -MSH uzrādīja tam raksturīgu cAMF līmeņa stimulāciju, sasniedzot maksimālo efektu 1 nM koncentrācijā. Betulīns nestimulēja cAMF producēšanos ne peļu melanomas šūnās, ne COS–7 šūnās. Turpmākajos pētījumos pievienojām betulīnu nemainīgā 100 μ M koncentrācijā pie mainīgām α -MSH koncentrācijām un novērojām, ka betulīns inhibē α -MSH efektu pie zemākām par 2 nM α -MSH koncentrācijām, bet uz augstākām α -MSH koncentrācijām betulīna ietekme vairs neizpaužas. Betulīns neietekmēja arī α -MSH maksimālo cAMF stimulācijas efektu. Ar betulīnu vai bez betulīna α -MSH ietekmē cAMF līmenis palielinājās 9–10 reizes virs bazālā līmeņa.



12.att. Vielu efekti uz cAMF līmeni B16-F1 šūnās.

Bazālais līmenis – rombs, kvadrāti betulīna efekti, trīsstūri – α -MSH efekti, apļi – betulīns 100 μ M koncentrācijā + mainīgas α -MSH koncentrācijas.

* P α -MSH efekti pret betulīns + α -MSH.

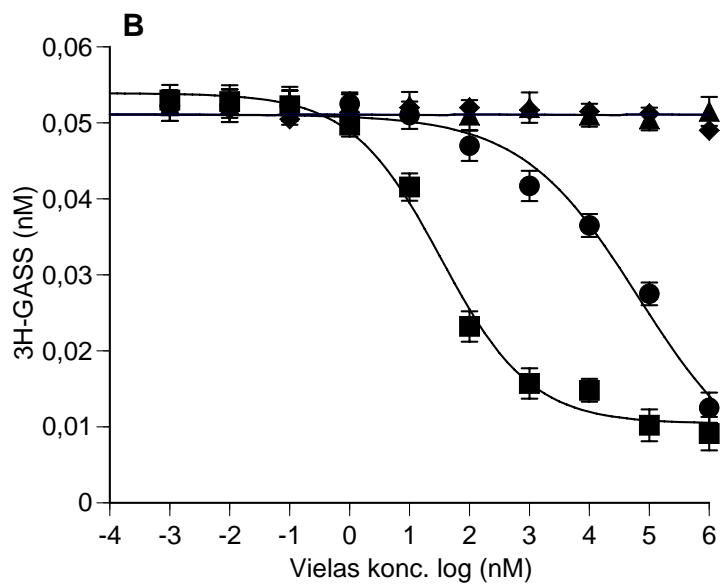
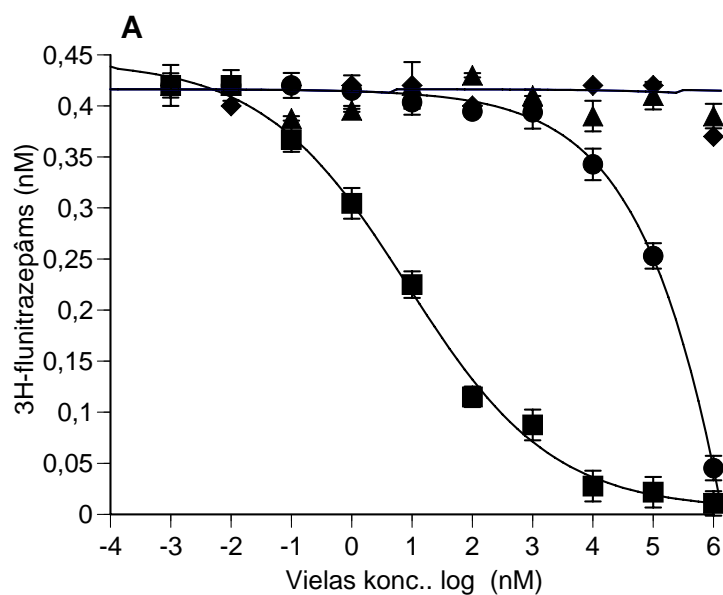
4.3. Betulīna saistīšanās pie GASS_A receptora benzodiazepīnu un GASS saistīšanās vietām

Iegūtie dati triterpēnu konkurences testā ar iezīmēto flunitrazepāmu parādīja, ka betulīnskābe un lupeols vispār nekonkurēja par saistīšanos pie benzodiazepīnu saistīšanās vietas uz GASS_A receptora (13.att.), bet betulīna šķietamo saistīšanos varēja izskaidrot ar DMSO efektu. Izrādījās, ka DMSO koncentrācijās virs 5% pats samazina flunitrazepama saistīšanās spēju. Tāpēc pieņēmām, ka neviens no pārbaudītajiem triterpēniem ticami nekonkurē ar flunitrazepāmu par saistīšanos pie benzodiazepīnu saistīšanās vietas. Kā kontroli un references vielu izmantojām diazepamam. Diazepams saistījās ar K_i 6 ± 2 nM koncentrācijā un zemu nespecifisko saistīšanos 1–4%, kas liecina par atbilstoši sagatavoto audu materiālu un labu eksperimentu kvalitāti.

DMSO mazāk ietekmēja [³H]GASS saistīšanos pie GASS saistīšanās vietas uz GASS_A receptora. Efekts bija pamanāms sākot no DMSO 20% koncentrācijas, tāpēc betulīna konkurence ar iezīmi šajos eksperimentos ir ticama. Betulīns saistījās pie GASS saistīšanās vietas ar K_i koncentrāciju 64 ± 5 μ M. Betulīnskābe un lupeols

nesaistījās un neizmainīja iezīmētās GASS afinitāti. Kā kontroli un references vielu izmantojām neiezīmēto GASS un tai noteicām K_i , kas bija apmēram 10 nM koncentrācijā.

Šajos eksperimentos pierādījām betulīna selektīvo saistīšanos pie GASS_A receptora – tieši pie GASS saistīšanās vietas.



13.att. Vielu saistīšanās pie GASS_A receptora.

A. Kvadrāti – diazepams, apļi betulīns, trīsstūri – betulīnskābe, rombi – lupeols.

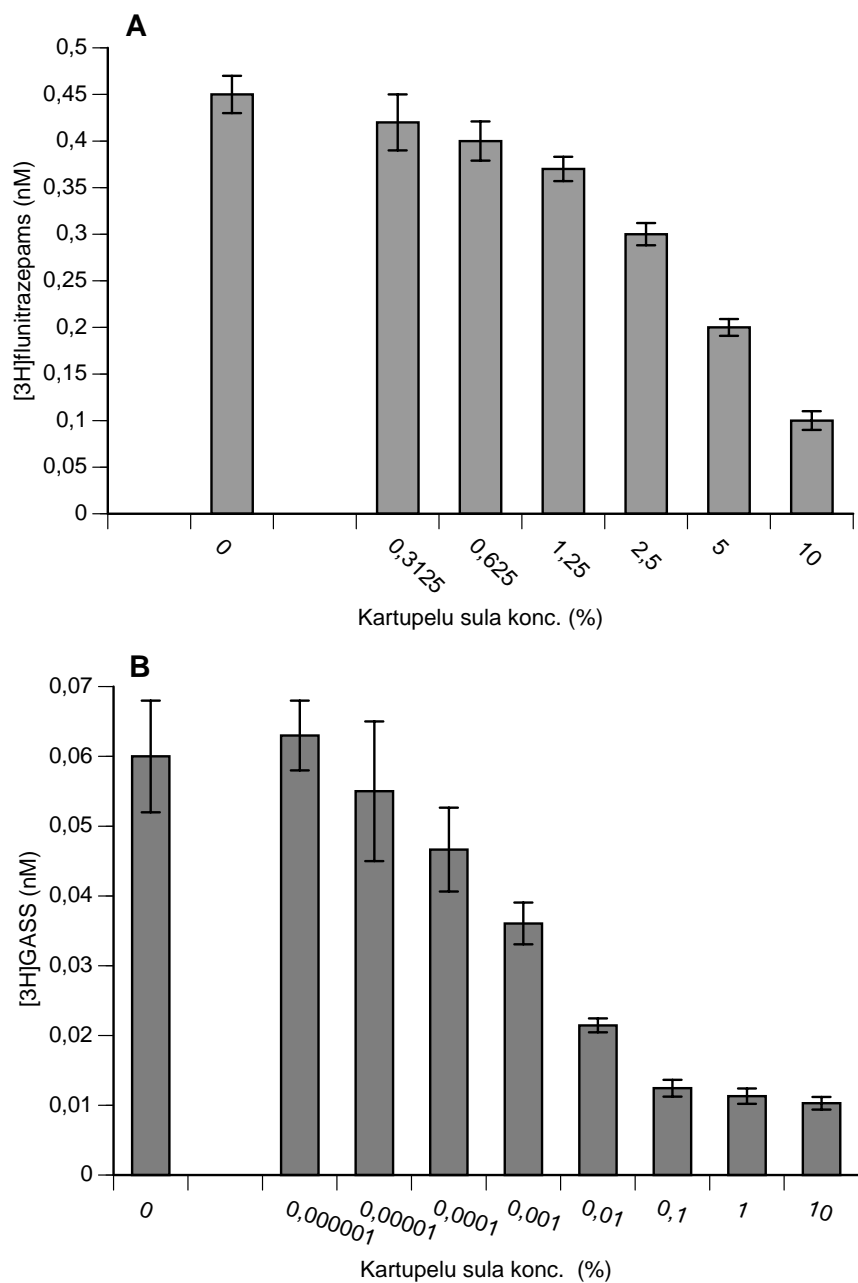
B. Kvadrāti – GASS, apļi betulīns, trīsstūri – betulīnskābe, rombi – lupeols.

4.4. Kartupeļu sulas saistīšanās ar benzodiazepīnu un GASS saistīšanās vietām uz GASS_A receptora

Arī šajos eksperimentos diazepāms un GASS kalpoja kā references un kontroles vielas. Kartupeļu sula konkurēja ar iezīmēto [³H]flunitrazepamu no koncentrācijas atkarīgā veidā, uzrādot inhibīcijas koncentrāciju IC₅₀ 2,0 ± 0,7% atšķaidījumā (A, att.14). Nespecifisko saistīšanos noteicām ar diazepāmu 2 mM koncentrācijā un tā bija apmēram 3%. Zinot, ka kartupeļos ir dažādi benzodiazepīni, aprēķinājām benzodiazepīnu saturu pēc diazepāma ekvivalenta (pieņemot, ka visiem konkurējošiem benzodiazepīniem būtu tāda pati afinitāte kā diazepāmam). Gan 2005. gada, gan 2006. gada kartupeļu ražas paraugos diazepāma ekvivalentu līmenis bija apmēram 2,85 ± 0,52 ng/ml.

Kartupeļu sula ļoti spēcīgi konkurēja ar iezīmēto GASS par saistīšanos pie GASS saistīšanās vietas un 50% inhibīciju uzrādīja atšķaidījumā 1:100 000 (B, att.14).

Jau atšķaidījumā 1:1000 kartupeļu sula pilnīgi izkonkurēja iezīmēto GASS. Kontroles testā GASS inhibīcijas konstante K_i bija 14 ± 6 nM, kas atbilst GASS saistīšanās afinitātei. Diazepāms slikti saistījās pie GASS saistīšanās vietas, tā K_i vērtība bija 19 ± 4 μM, kas liecina, ka kartupeļu sula saistās pie GASS vietas citu vielu nevis benzodiazepīnu dēļ. Mēs pieļāvām, ka kartupeļu sula satur GASS vai tai līdzīgas vielas ar augstu afinitāti pret GASS_A receptoru. Aprēķinot GASS ekvivalentu, ieguvām GASS koncentrāciju 300 ± 56 μg/ml.



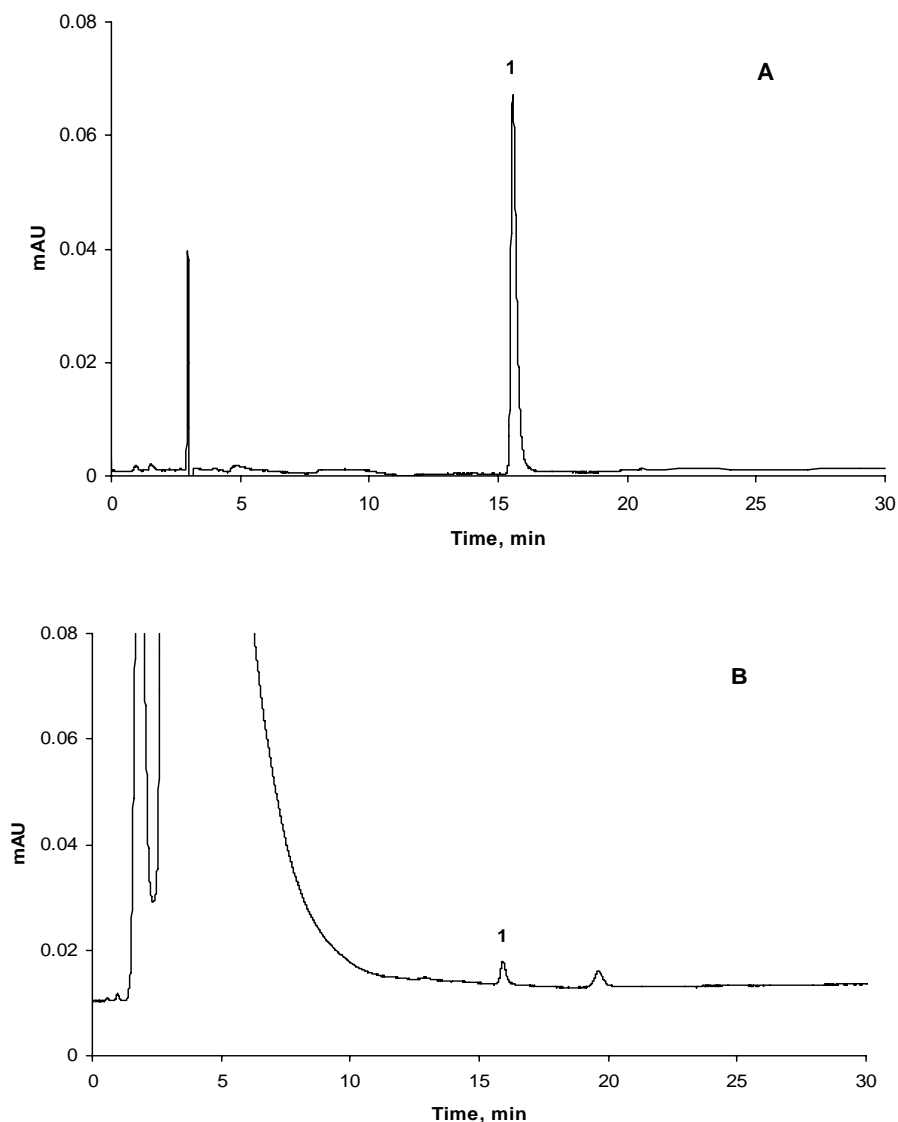
14. att. Kartupeļu sulas konkurence ar iezīmētiem GASS_A receptora ligandiem.

0 – kontrole bez kartupeļu sulas. Eksperimenti veikti ar paraugu dublikātiem un atkārtoti 3–4 reizes katra gada kartupeļu ražai.

Mēs novērojām, ka 2005. un 2006. gada kartupeļu efekti bija ļoti līdzīgi un abos gados ieguvām līdzīgas kartupeļu sulas konkurences līknes.

4.5. Diazepama pierādīšana kartupeļos

Salīdzinājām diazepama standartlīknes un kartupeļu sulas hromatogrammas, iegūtas identiskos AEŠH apstākļos. Korelācijas koeficients $r^2 > 0,99$ ($n=7$) uzrādīja lineāru procesu. Diazepama pīķa laiks bija $15,8 \pm 0,1$ min. Analizētajos kartupeļu paraugos diazepama pīķis bija labi atdalīts no citiem pīķiem (15. att.).

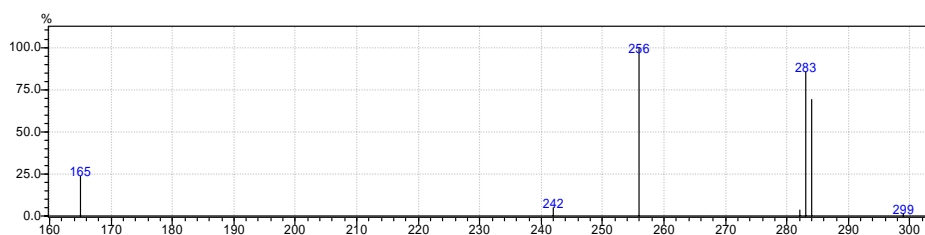
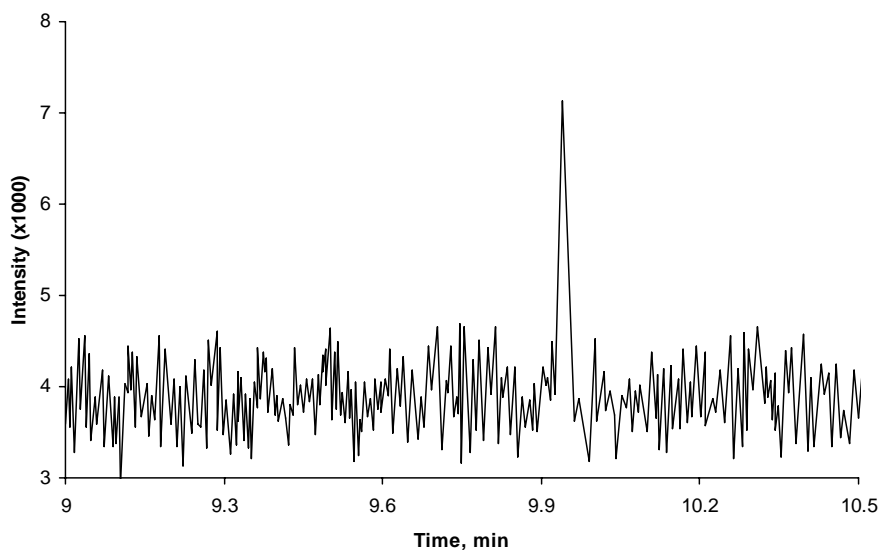


15. att. Diazepama noteikšana kartupeļu ekstraktos. Standarta (diazepāma) hromatogrāfija (A) un analizējamā „Adretta” kartupeļu parauga hromatogrāfija (B).

Izrēķinot iespējamo diazepama līmeni analizētajos paraugos pēc diazepāma standartlīknes, ieguvām datus, ka diazepams ir $0,038 \pm 0,01$ mg/kg kartupeļu.

Kartupeļu sulas diazepamu saturošo frakciju izolējām ar preparatīvās AEŠH koloniņu un analizējām ar gāzu hromatogrāfu (16. att.). Diazepams kalpoja kā references viela.

Monitorēto jonu intensitāte atbilda diazepama masspektru standartiem.



16.att.. Atdalītā savienojuma pīķa SIM veida hromatogramma un masspektromertijā atzīmētie diazepama joni (m/z 165, 256, 284).

Trīs kontrolētie joni tika atzīmēti, lai varētu analizējamo paraugu salīdzināt ar diazepāma standartu. Diazepama pīķa retences laiks ir 9,94 minūtes.

Iegūtie rezultāti rāda, ka diazepams kartupeļu sulā ir niecīgā daudzumā. Kartupeļu masas ekstraktos atrastā un identificētā diazepama saturs „Adretta” šķirnes kartupeļos ir apmēram 30 – 45 µg/kg.

Salīdzinot vairākas kartupeļu šķirnes atklājām, ka starp tām nav ticamas diazepama satura atšķirības. Tomēr negaidīti augstāku diazepama līmeni izmērījām nezināmas šķirnes kartupeļos, kurus audzē kādā Ērgļu rajona mājsaimniecībā.

Tabula 6. Diazepāma saturs Latvijā audzētās kartupeļu šķirnēs 2006.g.

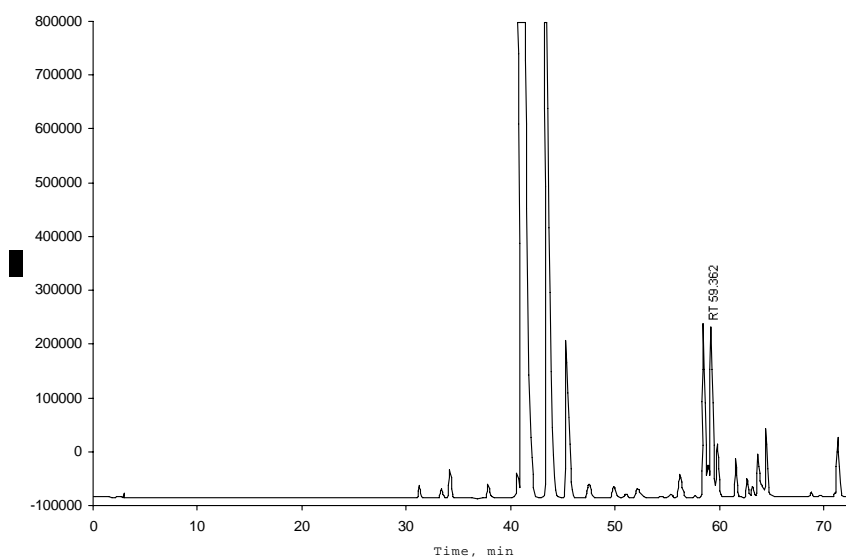
Kartupeļu šķirne	Diazepāma saturs mg/kg
Adretta	0.04 ± 0.1
Herta	0.028 ± 0.12
Laura	0.055 ± 0.1
Nezināma (audzēti Ērgļu apkaimes mājsaimniecībā)	1.02 ± 0.07 *

* Ticama atšķirība no pārējiem paraugiem. ANOVA tests, n=6

Tādējādi pierādījām diazepama identitāti un izmērījām diazepama saturu kartupeļu masā.

4.6. GASS noteikšana kartupeļu sulā

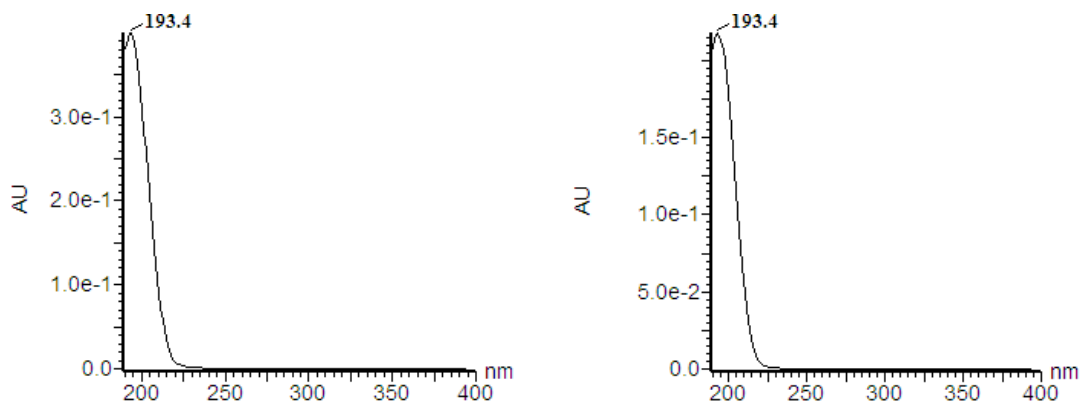
GASS kvantitatīvā AEŠH metode vēl jāturpina pilnveidot, jo, lietojot UV detektoru un dansilreaģentu, hromatogrammā ir redzami divi tuvu stāvoši pīķi (17.att.). Neskatoties uz to, aprēķini pēc standarlīknes liecināja, ka kartupeļu sulā ir augsts GASS līmenis 2 mg/ 10 µl.



17. att. GASS hromatogramma kartupeļu sulā

4.7. Glikoalkaloīdu saturs kartupeļos

Lai izvēlētos optimālo darba viļņu garumu, tika uzņemti katras standartvielas UV absorbcijas spektri. Veiktie eksperimenti parādīja, ka α -hakonīnam un α -solanīnam nav izteiktas UV absorbcijas virs 210 nm (18. att.).

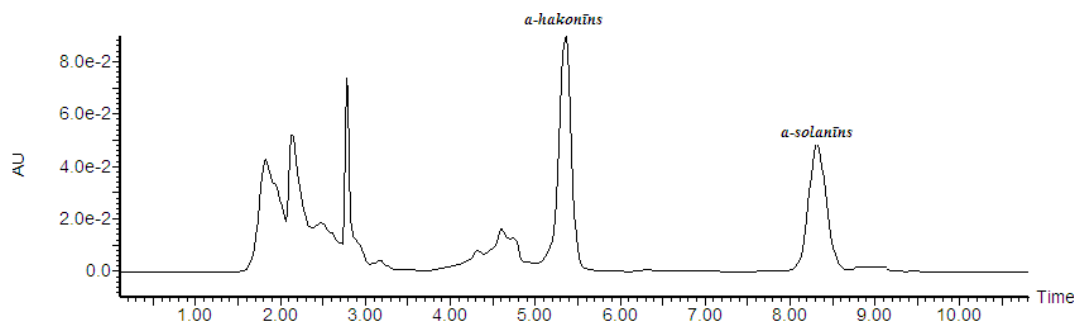


18. att. Glikoalkaloīdu α -hakonīna un α -solanīna UV absorbciju spektri

Šis fakts sarežģīja metodes izmantošanu, jo virs 220 nm analizējamās vielas vienkārši netiktu detektētas.

α -Solanīns un α -hakonīns ir savstarpēji izomēri, tāpēc to atdalīšana apgrieztās fāzes (AF) AEŠH apstākļos bija komplicēta. Izmēģinot virkni sorbentu un kustīgo fāžu, gala rezultātā veiktie eksperimenti parādīja, ka šo glikoalkaloīdu optimālai hromatogrāfiskai analīzei apgrieztās fāzes apstākļos nepieciešama augsta organiskā modifikatora koncentrācija (75%). Par sorbentu izmantojām vielu sadalīšanas koloniņu, kas satur NH_2 grupas. Šādas koloniņas parasti izmanto tādu izomēru kā glikoalkaloīdu vai dažādu cukuru atdalīšanai, ko ir grūti vai vispār nav iespējams realizēt uz tipiskām *C18* sorbentu saturošām vielu atdalīšanas kolonām.

Lai uzlabotu sistēmas efektivitāti abiem pētāmajiem savienojumiem, palielinājām vielu sadalīšanas kolonas temperatūru līdz 40°C. Rezultātā abu savienojumu savstarpējā izšķiršana (R_s) ir robežās no 6-7, kas ir augsts rādītājs apgrieztās fāzes AEŠH ($R_s > 1,5$).

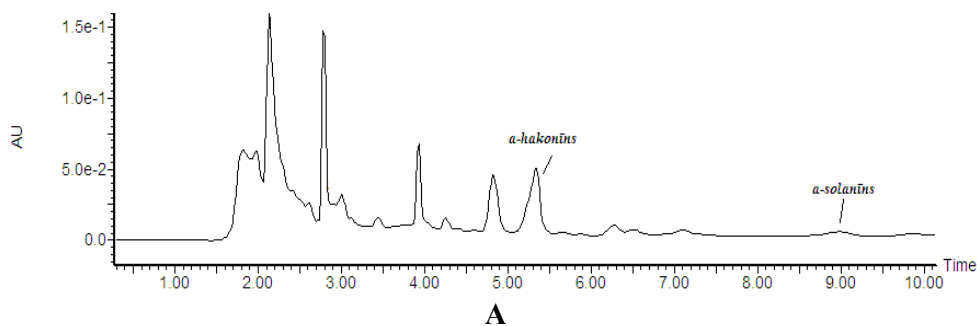


19. att. Glikoalkaloīdu α -hakoniņa un α -solanīna hromatogramma pēc CME atdalīšanas ar *Spherisorb NH₂* kolonnu un acetonitrilu/20 mM KH₂PO₄ (pH 6) šķīdumu kā kustīgo fāzi

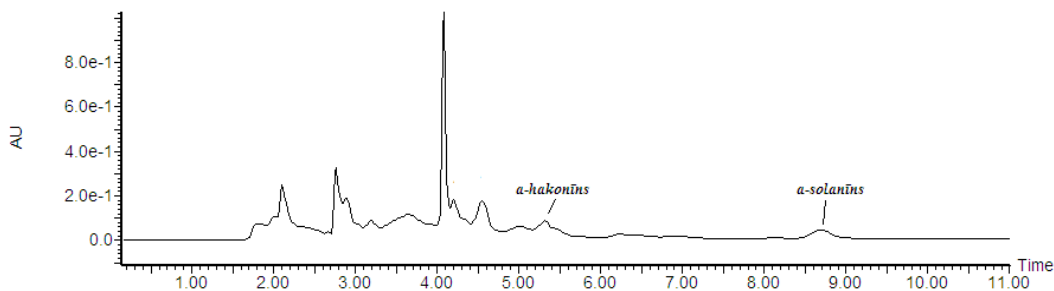
Hromatogrammā (19. att.) redzams, ka pirms abu standartvielu joslām eluējās arī citas traucējošās joslas, kuras rada gan kustīgā fāze, gan cietfāzes mikroekstrakcijā izmantotie šķīdinātāji, kuri visi nedaudz absorbē pie zemajiem viļņiem (210 nm).

Aprēķinot procentuāli, cik liela koncentrācija tika ievietota un pēc tam atgūta pēc CME, tika secināts, ka zudums nav liels, rezultāti ir pārsteidzoši augsti (apmēram hakoniņam 99%, solanīnam 98%).

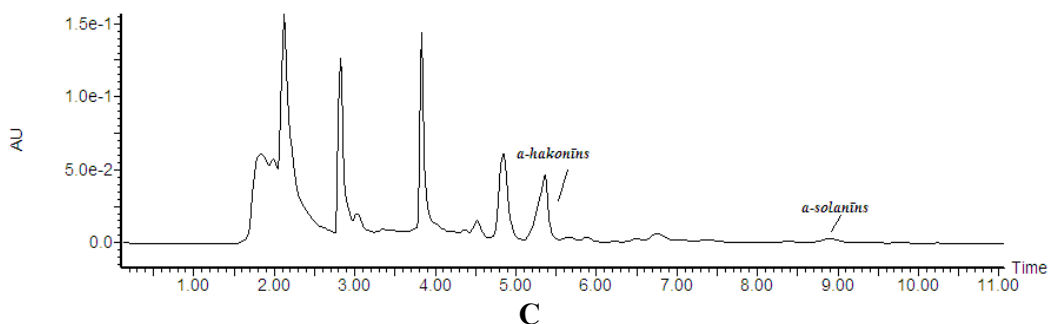
Pēc metodes validācijas izmērījām glikoalkaloīdu saturu kartupeļos. Piemēri parādīti 20. attēlā.



A



B



20..att. Glikoalkaloīdu α -hakoniņa un α -solanīna noteikšana Latvijā audzētos kartupeļos. A-Laura bez mizas; B-Laura ar mizu; C-Adretta bez mizas

Vēl tika veikta kartupeļu analīze divām vecākām kartupeļu šķirnēm – „Borodina” un „Agrie dzeltenie”, un kartupeļiem „Mutagēnagrie”.

Tabula 7. Glikoalkaloīdu α -solanīna un α -hakoniņa saturs Latvijā audzētos kartupeļos

Šķirne	Kartupeļu sula			Kartupeļi		
	Hakonīns, mg/ml	Solanīns, mg/ml	Kopējais vidējais, mg/mL	Hakonīns, mg/100 g kart.	Solanīns, mg/100 g kart.	Kopējais, vidējais mg/100 g kart.
Laura bez mizas	0,079± 0,008	0,015± 0,006	0,094	1,264± 0,08	0,240± 0,008	1,5
Laura ar mizu	0,064± 0,004	0,113± 0,005	0,177	1,024± 0,05	1,808± 0,03	2,8
Adretta bez mizas	0,073± 0,002	0,011± 0,004	0,084	1,168± 0,06	0,176± 0,08	1,3
Mutagēn agrie bez mizas	0,0074± 0,008	0,0047± 0,0003	0,0121	0,118± 0,08	0,0752± 0,008	0,19
Mutagēn agrie ar mizu	0,0640± 0,006	0,0166± 0,008	0,0806	1,024± 0,02	0,2656± 0,004	1,29
Borodina bez mizas	0,0306± 0,008	0,0048± 0,0008	0,0354	0,499± 0,008	0,0768± 0,003	0,58
Agrie dzeltenie bez mizas	0,1191± 0,01	0,0155± 0,003	0,1346	1,906± 0,004	0,248± 0,002	2,15

Glikoalkaloīdu saturs sulā un blenderētos kartupeļos atšķiras. Mēs nenoteicām visu glikoalkaloīdu saturu, bet, pieņemot, ka α -solanīns plus α -hakoniņš sastāda 95% no visiem glikoalkaloīdiem, nevienā gadījumā kopējais vidējais glikoalkaloīdu līmenis

nepārsniedz atļautos 18–20 mg/100 g (Tomoskozi – Farkas et al., 2006). No 100 g kartupeļu ieguvām apmēram 35 – 50 ml sulas.

Salīdzinot iegūtos rezultātus, secinājām, ka visaugstākais glikoalkaloīdu līmenis kartupeļos, kas analizēti bez mizas, ir šķirnē „Agrie dzeltenie”, bet viszemākais – kartupeļu šķirnē „Borodina”.

Kartupeļos, kuri analizēti ar mizu, visaugstākais glikoalkaloīdu līmenis bija šķirnes „Laura” kartupeļos, bet viszemākais – „Mutagēnagrie” šķirnes kartupeļos.

Salīdzinot hakonīna un solanīna daudzumu, redzams, ka visās kartupeļu šķirnēs hakonīna daudzums ir augstāks kā solanīna. Piemēram, kartupeļu šķirnē „Laura”, kas analizēti bez mizas, hakonīna saturs ir apmēram 5 reizes augstāks salīdzinājumā ar solanīna daudzumu.

4.8. Polifenolu saturs kartupeļu šķirnēs – „Adretta”, „Herta” un „Laura”

Polifenolu saturu noteicām ar destilētu ūdeni atšķaidītai kartupeļu sulai (atšķaidījums 1:10 – kartupeļu sula destilētā ūdenī).

Kartupeļu sulu pirms absorbcijas mērīšanas 5 min nocentrifugējām 3200 apgr./min. Polifenolu saturu izteicām galluskābes ekvivalentos pēc galluskābes standartlīknes.

Tabula 8. **Galluskābes ekvivalenti dažādu Latvijā audzētu kartupeļu atšķaidītās sulās**

Kartupeļu šķirne	Galluskābes koncentrācija, (mg/ml)
Adretta	0,082 ± 0,004
Herta	0,094 ± 0,006
Laura	0,11 ± 0,008

Kopējais polifenolu saturs dažādās šķirnēs nedaudz svārstās, vidēji sastādot 0,095 ± 0,006 galluskābes ekvivalentu mg/ ml kartupeļu sulas. Ņemot vērā sulas atšķaidījumus 1:10 kopējais polifenolu daudzums ir 95 ± 6 galluskābes ekvivalentu mg/ml kartupeļu sulas.

5. DISKUSIJA

5.1. Betulīna selektīvā piesaistīšanās pie MK receptora pirmā apakštipa

Mēs atklājām un pirmo reizi parādījām augu triterpēna betulīna spēju saistīties ar cilvēka MKR apakštipiem un salīdzinājām tā afinitāti ar dabīgajiem melanokortīniem. Betulīns uzrādīja selektivitāti pret pirmo apakštipu. Tieši MKR1 ir atrasts gandrīz visās ādas šūnās un regulē epidermas melanocītu proliferāciju un diferencēšanos (Roberts et al., 2006; Wikberg et al., 2001; Catania et al., 2004). Kaut gan betulīna afinitāte ir daudz zemāka nekā α -MSH, tā ir salīdzināma ar peptīdu serdes fragmenta afinitāti (Schioth et al., 1997), bet afinitāte pret MKR4 un MKR5 ir tuvu dabīgo hormonu β -MSH un γ -MSH afinitātei (Schioth et al., 1996). Tieši serdes daļas fragments ir izmantots jaunu sintētisku MKR ligandu meklējumos un veiksmīgs atradums ir peptīds melanotāns I un cikliskais peptīds melanotāns II, kas ir klīniski pārbaudīti kā ādas pigmentāciju veicinoši līdzekļi (Catania et al., 2004). Vēlāk klīnikā melanotānam II atklāja erekcijas pastiprināšanas efektu un uz tā bāzes sintezē jaunus analogus. Abi melanotāni samazina risku saslimt ar ādas vēzi (Hadley and Dorr, 2006).

Daudziem līdz šim sintezētajiem MKR ligandiem piemīt pretiekaisuma, pretaptaukošanās, pretmelomas un seksuālo funkciju stimulējoši efekti, tāpēc atrastā betulīna afinitāte pret MKR var tikt izmantota jaunu MK mimētiķu sintēzei.

DMSO ļoti bieži izmanto kā šķīdinātāju, tāpēc par DMSO efektiem ir diskutēts daudzu autoru darbos. To izmanto arī šūnu līniju saldēšanā kā krioprotektējošu vielu. Pētot saldēšanas ietekmi hematopoētiskajām priekšteču šūnām, pierādīja, ka DMSO arī cilmes šūnas pasargā no bojājumiem sasaldēšanas laikā (Veeraputhiran et al., 2010). DMSO piemīt šūnu membrānu caurlaidības pastiprināšanas spēja (Macdonald et al., 2010) un tas ir ticis lietots kā pretsāpju, pretreimatisma un pretiekaisuma līdzeklis. Tomēr šūnu un orgānu kultūrās atkarā no koncentrācijas DMSO var uzrādīt toksiskus efektus. Pētījumā ar žurku auss šūnām noskaidroja, ka DMSO koncentrācijās no 0,5 līdz 6% izraisa apoptozi (Qi et al., 2008), bet 0.1% DMSO nobloķēja [α -¹²⁵I]bungarotoksīna saistīšanos ar acetilholīna N tipa receptoriem (Eaton et al., 1997). Mēs neatradām literatūrā publicētus datus par DMSO saistīšanos pie MKR, tāpēc uzskatām, ka esam pirmie, kas publicēja datus par DMSO saistīšanos vai saistīšanās

imitāciju ar MKR. Mēs secinājām, ka MKR receptori *in vitro* koncentrācijas atkarīgā veidā ir jutīgi pret DMSO. Mēs nenovērojam DMSO selektivitāti un nevaram spriest, vai DMSO saistās vai sabojā receptora proteīna struktūru un tādējādi pasliktina no DMSO koncentrācijas atkarīgā veidā ligandu saistīšanās spēju. Tomēr literatūrā ir dati, ka DMSO pastiprina pigmentāciju melanomas šūnās un melanocītos (Brown, 2001), kas netieši norāda uz iespējamu iedarbību uz MKR1.

Visi MKR apakštīpi ir ar G_s proteīnu saistītie receptori un to aktivācija stimulē cAMF producēšanos un cAMF signālceļu ierosināšanu (Wikberg et al., 2001). cAMF testu izmanto, lai atklātu, vai MKR ligands darbojas kā agonists vai antagonists. Literatūrā ir aprakstīts, ka cilvēku melanomas šūnu bagātināšana ar MKR1 izraisīja cAMF bāzes līmeņa paaugstināšanos (Mas et al., 2003). Tātad arī MKR1 ekspresijas blīvuma izmaiņas var ietekmēt cAMF producēšanos šūnās. Mūsu eksperimentos betulīns antagonizēja α -MSH efektu pie zemākajām α -MSH koncentrācijām, iespējams, betulīns tā varētu samazināt ādas pigmentāciju, kuru α -MSH stimulē. Betulīns kā balinātājs tiek lietots kosmētikā bez šī efekta molekulārā mehānisma skaidrojuma.

Kaut gan betulīnskābei ir spēcīgāka pretvēža aktivitāte kā betulīnam (Zuco et al., 2002; Fulda et al., 1999; Alakurti et al., 2006) un tieši selektīva citotoksicitāte pret melanomas šūnām (Pisha et al., 1995), betulīnskābei un lupeolam saistīšanos pie MKR nenovērojam. Iespējams, nelielās triterpēnu struktūras atšķirības tomēr ietekmē to saistīšanos pie receptora proteīna un betulīnam piemīt īpašības, kas vajadzīgas, lai iekļūtu receptora saistīšanās „kabatā” (*binding pocket*). Mēs neatradām pierādījumus, ka betulīnskābes antimelanomas darbība saistīta ar MKR stimulāciju vai bloķēšanu.

Iegūtie rezultāti rāda, ka turpmākie MKR pētījumi varētu palīdzēt noskaidrot betulīna un citu augu triterpēnu pretvēža un antiHIV efektu molekulāros mehānismus un uz triterpēnu molekulu struktūru bāzes radīt jaunus zāļu līdzekļus.

5.2. Betulīns – G_{ASS_A} receptora agonists

Darba hipotēze, pētot triterpēnu CNS efektus, balstījās uz to lipofilo dabu un spēju šķērsot asinsvadu–smadzeņu barjeru un nonākt smadzenēs. Mūsu pieņēmums izrādījās pareizs un līdzīgi kā eksperimentos ar MKR mēs novērojam betulīna saistīšanos ar G_{ASS_A} receptori. Izrādījās, ka no pārbaudītajiem lupāna rindas

triterpēniem tikai betulīns saistās ar GASS_A receptoru, konkurējot ar [³H]GASS par saistīšanās vietām. Betulīnskābe un lupeols nekonkurēja ne ar benzodiazepīnu saistīšanās vietas iezīmi [³H]flunitrazepamam, ne ar GASS saistīšanās vietas iezīmi [³H]GASS.

Endogēni GASS sintezējas no glutamāta, piedaloties enzīmam L-glutamīnskābes dekarboksilāzei, un kā kofaktors darbojas piridoksālfosfatāze. GASS medicīnā nelieto, jo tā ir smadzeņu endogēna viela, kas slikti šķērso smadzeņu-asinsvadu barjeru, tomēr ievadīta eksogēni, tā var piesaistīties pie perifēriem receptoriem un nelielā daudzumā nonākt smadzenēs (Vignolo et al., 1992). Organismā GASS saistās ar specifiskiem transmembrānu receptoriem plazmas membrānās, kas pēc struktūras ir hlora jonu kanāla lielmolekulārs komplekss. GASS piesaistīšanās atver hlora jonu kanālu, tādējādi paverot ceļu negatīvi lādēto hlora jonu ieplūšanai šūnā vai pozitīvi lādēto kālija jonu izplūšanai no tās, izraisot hiperpolarizāciju un neironālo inhibīciju. GASS ir smadzeņu darbību bremsējošs mediators, kas piesaistās pie GASS receptoriem, kurus iedala divās lielās klasēs – jonotropie (GASS_A un GASS_C) un metabotropie receptori (GASS_B). No šiem trim apakštipiem visvairāk izpētīti ir GASS_A receptori. Šim kompleksam ir piecas saistīšanās vietas, kas var piesaistīt GASS, benzodiazepīnus, barbiturātus, konvulsantus un neurosteroīdus (Holtkamp and Meierkord, 2000). Šīs vielas, saistoties ar GASS receptoru, izraisa tā stimulāciju un CNS nomierinošu efektu, bet antagonisti (bikukulīns) izraisa krampjus.

Organisma normālai funkcionēšanai GASS līmenim smadzenēs jābūt sabalansētam. Nesabalansēts GASS līmenis smadzenēs ir pie dažām slimībām (Alcheimera, Hungtingtona, Pārkinsona slimība, arī epilepsijas gadījumos). Šajos gadījumos ir nepieciešams stimulēt GASS_A receptorus ar sintētiskām zāļu vielām – barbiturātiem, benzodiazepīniem, kuriem ir atšķirīgas piesaistīšanās vietas pie šiem receptoriem.

Arī GASS_A receptoru saistīšanas testos šķīdinātājs DMSO izmainīja abu iezīmju spēju piesaistīties pie receptora proteīna, īpaši samazinot benzodiazepīnu vietas iezīmes flunitrazepama saistīšanos. DMSO ietekme bija tik liela, ka betulīna saistīšanos nevarējām novērtēt kā ticamu. Literatūrā citi pētnieki apraksta DMSO spēju pat 1% koncentrācijā par 80% samazināt citas iezīmes – konvulsantu saistīšanas vietas liganda [³²S]TBPS saistīšanos (Holopainen et al., 2001). Pierādīts, ka tikai 0,1% koncentrācijā DMSO neizmaina GASS mediēto jonu kanālu atvērumu (Wexler et al., 1998). Mūsu

eksperimentos DMSO sākot no 20% koncentrācijas traucēja [³H]GASS saistīšanos, bet flunitrazepama - sākot no 5% koncentrācijas.

Veicot *in vivo* eksperimentus, mēs atklājām betulīna antikonvulsīvo darbību pēc intracisternālas un i.p. injekcijas pelēm, jo betulīns inhibēja bikukulīna izraisītos krampjus (Muceniece et al., 2008). Šajā darbā aprakstītie radioligandu saistīšanās pētījumi izskaidro betulīna CNS efektu molekulāro mehānismu.

Betulīnskābe un lupeols *in vivo* darbību neuzrādīja, un tas ļoti labi atbilst *in vitro* radioligandu saistīšanās testā iegūtajiem rezultātiem. Tomēr šie rezultāti bija negaidīti, jo tieši betulīnskābei ir aprakstīta anksiolītiskā darbība pēc i.p. un orālas ievadīšanas pelēm un žurkām un tieši betulīnskābes anksiolītiskā darbība kā atklājums ir patentēta (Durst et al., 2002). Mums neizdevās noskaidrot betulīnskābes darbības molekulāros mehānismus un mēs pat nenovērojām betulīnskābes pretkrampju darbību *in vivo*. Betulīnskābes iedarbība uz smadzeņu neiromediatoru receptoriem un anksiolītiskie efekti joprojām paliek neskaidri, jo tā nesaistās ar veselu virkni smadzeņu neiromediatoru receptoriem (Zhu et al., 1996). Tomēr nenoliedzami arī betulīnskābe nokļūst smadzenēs, jo gan betulīnam, gan betulīnskābei ir pierādīta antiHIV darbība smadzenēs (Alakurtti et al., 2006).

Atklātie betulīna antikonvulsanta efekti ļauj mums secināt, ka betulīns ir GASS_A receptoru agonists. Iespējams, ka betulīnam arī piemīt anksiolītiska darbība.

Uz muskuļu tonusu (*rota-rod* tests) neiedarbojās neviens no trim lupāna rindas triterpēniem (Muceniece et al., 2008).

Mēs gan MKR, gan GASS receptoru pētījumos parādījām, kaniecīgas struktūras izmaiņas pat tik radniecīgos savienojumos kā triterpēnu atvasinājumos spēj izmainīt to bioloģiskos efektus.

5.3. Kartupeļu bioaktīvo vielu loma kartupeļu kā funkcionālā uztura izvērtēšanā

5.3.1. Benzodiazepīni un GASS kartupeļos

Dažādām kartupeļos atrastajām vielām ir veikti pētījumi izolētā veidā, bet *in vivo* kartupeļu produktu pētījumi notiek pavisam nesen, jo visu laiku ir valdījis uzskats, ka pārtikas produktiem *in vivo* eksperimentos neizdosies reģistrēt pārlicinošus efektus.

Benzodiazepīni kartupeļos un augos tika atrasti jau pagājušā gadsimta 80.os (Wildmann et al., 1988) gados, bet šie atklājumi kalpoja tikai kā pierādījums, ka cilvēku un dzīvnieku smadzenēs benzodiazepīni nonāk ar pārtiku. Pārtikas augu benzodiazepīnu saturam nepiešķir lielu nozīmi, jo salīdzinājumā ar benzodiazepīnu, piemēram, diazepama terapeitisko dienas devu (5-20 mg), kartupeļos esošā diazepama daudzums ir niecīgs.

1988. gadā kartupeļu bumbuļos konstatētais diazepama un delorazepama daudzums bija apmēram 250 ng/kg, turpretī N-desmetildiazepama daudzums – 500 ng/kg (Wildman et al., 1988).

Tabula 9. Benzodiazepīnu (Bzd) saturs kartupeļos salīdzinājums

Benzodiazepīns	IC50 nM	Atrastais benzodiazepīnu daudzums 20g randomizēti iepirktu nenoteiktas šķirnes kartupeļu		
		ng Diazepāma ekvivalentos (DE)	AEŠH dati GC/MS ng	
Diazepāms	8,6	5	5	
N-desmetildiazepāms	9,2	10	10	
Lorazepāms	1,6	5	1	
Delorazepāms	1,8	10-20	5	
	Tikko novāktos	Pēc 5 mēnešu uzglabāšanas 10⁰ C		
	Kopējā masa (ng DE)/20 g	Kartupeļu serde (ng DE)/20 g	Ārējā kārtā (ng DE/20 g)	Asni ngDE/20 g
Summāri Bzd		20-60	25-70	250-350
Summāri BZD	80			
		ng/g		
Lormetazepāms	Nav noteikts	0,05-0,1	0,05-0,1	0,4-0,6
		Audu kultūrās		
Temazepāms		100-450 ng/g		
Diazepāms		60-70 ng/g		

Dati no Wildman et al., 1988; Wildman, 1988 un Kavvadias et al., 2000.

DE – diazepāma ekvivalenti

Mūsu eksperimentos diazepāms kartupeļu sulā ar AEŠH metodi netika atrasts, bet kartupeļu masas ekstraktos ar organiskiem šķīdinātājiem vidēji tika atrasti 30 – 45

µg/kg diazepama. Iespējams, ka radioligandu saistīšanās eksperimentos mēs novērojām kartupeļu sulas saistīšanos un konkurenci ar iezīmēto flunitrazepamu summārā benzodiazepīnu līmeņa dēļ jeb radioligandu saistīšanās metode ir jutīgāka par AEŠH. Diazepama līmenis kartupeļos var atšķirties, par to liecināja dažādu šķirņu kartupeļu un nezināmas šķirnes kartupeļu diazepama līmeņu salīdzinājums.

Atšķirības starp Latvijā audzēto kartupeļu diazepama un 1988.gadā noteiktajiem un literatūrā publicētajiem diazepama daudzumiem var izskaidrot ar izmantoto ekstrahēšanas metožu dažādību. Atšķirību iemesls var būt arī dažādās kartupeļu šķirnes, kas tika izmantotas pētījumos (ģenētiskie faktori), klimata atšķirības, kartupeļu augšanas un uzglabāšanas apstākļi u.c.

Diazepams ir termostabils benzodiazepīns (Jumaa and Muller, 2002). Tāpēc mēs pieņemām, ka tā daudzums ēdiena gatavošanas (vārīšanas, cepšanas) procesā nemainās, tas ir tāds pats kā termiski neapstrādātos kartupeļos.

Mēs esam pirmie (Muceniece et al., 2008), kas publicēja datus par kartupeļu sulas saistīšanos ar smadzeņu GASS_A receptoru un dažādu ligandu saistīšanās vietām (GASS un benzodiazepīnu) uz tā. Vislielākais atklājums ir kartupeļu GASS–ergiskās aktivitātes pierādīšana *in vivo*, kas izpaudās kā kartupeļu sulas antagonisms ar bikukulīnu un tā rezultātā novērojām pretkramju darbību (Muceniece et al., 2008). Kartupeļu sulai piemita ļoti spēcīga konkurence ar iezīmēto GASS, uzrādot 2500 reizes lielāku afinitāti pret GASS saistīšanās vietu kā pret benzodiazepīnu saistīšanās vietu. Šī konkurence par saistīšanos ar GASS izskaidro kartupeļu sulas pretkramju darbības mehānismu.

AEŠH analīze pierādīja augstu GASS līmeni kartupeļu sulā. Kaut gan AEŠH hromatogrammā GASS pīķis pilnīgi neatdalījās no otra tuvu stāvoša pīķa, aprēķinātā GASS koncentrācija paraugā kopā ar radioligandu saistīšanās datiem liecina par bioloģiski ievērojamu GASS daudzumu kartupeļos. Vēl pārliecinošāk to demonstrēja pētījumi *in vivo* eksperimentos, ievadot neatšķaidītu un atšķaidītu 1:2 kartupeļu sulu pelēm (Muceniece et al., 2008). Kartupeļu sulas antikonvulsantā darbība tika novērota abu pētāmo gadu 2005. un 2006. gada ražas kartupeļos gan pēc intracisternālas, gan pēc *per os* ievadīšanas. Arī GASS ir termostabila viela (Enna et al., 1977) un saglabājas kartupeļu produktos pēc termiskas apstrādes.

No laboratorijas dzīvnieku eksperimentiem mēs secinām, ka kartupeļu lietošana var veicināt bioaktīvo vielu nonākšanu smadzenēs arī pēc orālas to uzņemšanas.

Japānas zinātnieki līdzīgi mums ir uzsākuši pētīt GASS līmeņus pārtikas produktos. Viņi ir publicējuši pārskatu par GASS līmeni 22 kartupeļu šķirnēs un izmērījuši, ka tas ir no 16 līdz 61 mg/100 g kartupeļu (Nakamura et al., 2006). Pētot dažādus kartupeļu izstrādājumus (nūjiņas, čipsus), parādīts, ka GASS līmenis ir apmēram 7–8% no visu aminoskābju daudzuma un kartupeļu produktos tas ir vēl augstāks, jo tajos ir mazāk ūdens un vairāk sausnes kā svaigos kartupeļos ((Nakamura et al., 2006). *Noguchi et al.*, 2007 pievērta uzmanību GASS jonu kanālu darbībai: negatīvi lādētie hlora joni ieplūst šūnā, bet pozitīvi lādētie kālija joni izplūst no tās, izraisot šūnas hiperpolarizāciju. Tāpēc šie autori izteica hipotēzi, ka komplektā GASS un kālija joni kartupeļos un kartupeļu pārstrādes produktos varētu samazināt asinsspiedienu. Ievadot *per os* kartupeļu uzkodas spontānās hipertensijas žurkām un normāla asinsspiediena žurkām, pēc 30 min žurku asinīs novēroja GASS līmeņa paaugstināšanos, tātad bija notikusi absorbcija, bet pēc 4–8 h hipertensijas modeļa žurkām novēroja asinsspiediena pazemināšanos. Kontroles žurkām spiediens nemainījās. Bagātinot kartupeļu produktus ar GASS 1,7 mg/kg masas, spontānās hipertensijas žurkām asinsspiedienu varēja pazemināt pat par 35 mmHg. Tomēr GASS nav vienīgā viela kartupeļos, kas varētu pazemināt asinsspiedienu. 2005. g. pirmo reizi tika publicēti dati par kukoamīnu atrašanu kartupeļos (Parr et al., 2005). Kukoamīni ir vielas, kas atrastas Ķīnā augošu nakteņu dzimtas augs *Lycium chinense* lapās. Šo tēju Ķīnā lieto, lai pazeminātu asinsspiedienu. Pierādīja, ka tieši kukoamīni šajā tējā darbojas kā aktīvās vielas. Tomēr kukoamīni kartupeļos ir atklāti ļoti mazās koncentrācijās: mikrogramu desmitdaļās pārrēķinot uz 1 g sausnes, tāpēc ir šaubas, vai tie varētu būt asinsspiedienu pazeminoši ingredientī. Iespējams GASS, kukoamīni, kālija joni kopā sinerģiski regulē paaugstinātu asinsspiedienu un neizmaina normālu.

Visi citētie pētījumi liecina par GASS absorbēšanos asinsritē no kartupeļu produktiem un, iespējams, citiem pārtikas produktiem, un kopā ar mūsu datiem liecina par kartupeļu spēju kalpot par funkcionālu uzturu, jo aktīvo vielu efekti ir novērojami pēc kartupeļu sulas ievadīšanas pelēm *per os*.

5.4. Glikoalkaloīdu līmenis Latvijā audzētos kartupeļos

Pēc *EuroFacta* datiem 2007.gadā Latvijā kartupeļu patēriņš uz 1 iedzīvotāju ir bijis 219 kg gadā, bet visaugstākais tas ir bijis Baltkrievijā – 420 kg gadā uz 1

iedzīvotāju. Kartupeļi ir svarīga uztura sastāvdaļa gan cilvēkiem, gan arī dzīvniekiem, bet, ja tie tiek nepareizi novākti, uzglabāti vai pagatavoti, pastāv risks saindēties ar toksiskām vielām. Pēdējos desmit gados zinātnieku uzmanība koncentrēta uz kartupeļos esošo glikoalkaloīdu izraisīto toksicitāti cilvēku un dzīvnieku organismos. Cilvēkiem akūtas saindēšanās sindroms tiek novērots, ja uzņemto glikoalkaloīdu līmenis ir apmēram 2,8 mg/kg ķermeņa masas (Anonymous, 1993).

Kartupeļos, kuri ir svaigi, nav bojāti un nav ilgstoši pakļauti saules gaismai, glikoalkaloīdu līmenis ir normas robežās un toksiska iedarbība, lietojot tos uzturā, nav novērojama.

Lai varētu noteikt gan kvalitatīvo, gan kvantitatīvo glikoalkaloīdu α -hakonīna un α -solanīna saturu Latvijā audzētos kartupeļos, bija nepieciešams izstrādāt pilnvērtīgu to izdalīšanas metodi. Sākotnēji AEŠH metodes apstākļi tika izvēlēti pēc publikācijām (Steinkof et al., 2005; Lee et al., 2007; Li et al., 2004) un kartupeļu analīze daļēji tika veikta vadoties pēc šo autoru publikācijām, izmantojot cietfāzes mikroekstrakcijas (CME) koloniņas (angļu valodā - *solid phase microextraction* (SPE)). Apkopojot dažādus hromatogrāfisko metožu apstākļu aprakstus, secinājām, ka visbiežāk kustīgajā fāzē iesaka izmantot kālija fosfātu buferšķīdumus un acetnitrilu, kā arī trietilamonija fosfātu buferšķīdumus. Kustīgās fāzes režīms tiek izmantots gan gradientā, gan izokrātiski. Vielu atdalīšanas kolonnas izmēri visos gadījumos ir 4,6x150 mm, detektēšanas robežas ir intervālā no 200 līdz 210 nm.

Salīdzinot atrasto glikoalkaloīdu saturu ar agrāk publicētajiem glikoalkaloīdu pētījumiem (10. tabula) citās valstīs, redzam, ka Latvijā audzētos kartupeļos ir zemāks glikoalkaloīdu saturs. Pētījumam tika izvēlētas nejaušas kartupeļu šķirnes, kuras nopirkām tirgū no zemniekiem, un nevaram spriest par kartupeļu audzēšanas apstākļiem. Pētījumi tika veikti rudenī, tāpēc kartupeļu pareizai uzglabāšanai nav izšķirošas ietekmes uz glikoalkaloīdu daudzumu.

Tabula 10. Glikoalkaloīdu līmeņa kartupeļos salīdzinājums

Kartupeļu paraugi	Valsts	α -solanīns (mg/100g)	α -hakonīns (mg/100g)	Kopējais abu glikoalkaloīdu daudzums (mg/100g)
Nenoteiktas šķirnes kartupeļi ar mizu (Rigg, 1997)	Austrālija	1,45	2,87	4,32
„Monaliza” šķirnes kartupeļi ar mizu (Machado et al., 2007)	Brazīlija	1,43	3,71	5,14
Nenoteiktas šķirnes kartupeļi ar mizu (Zarzecka and Gugala, 2007)	Zviedrija	-	-	3,729
„Sante” šķirnes kartupeļi bez mizas (Abreu et al., 2007)	Portugāle	1,36	2,48	3,84
„Raja” šķirnes kartupeļi bez mizas (Abreu et al., 2007)	Portugāle	2,33	2,13	4,46
„Lorett” šķirnes kartupeļi ar mizu (Tomoskozi– Farkas et al., 2006)	Ungārija	-	-	15,0

„Lorett” šķirnes kartupeļos glikoalkaloīdu saturs 15 mg/100g jau tuvojas Pasaules Veselības organizācijas noteiktajai augstākai pieļaujamajai robežai 18 mg/100g (Tomoskozi–Farkas et al, 2006). Čehijā, divus gadus monitorējot glikoalkaloīdu saturu trijos dažādos rajonos audzētu kartupeļu šķirnēs, tika noteikts glikoalkaloīdu vidējais līmenis 31 – 166 mg/kg un atklātas šķirnes ar toksisku glikoalkaloīdu saturu (Panovska et al., 1997). Šādi atklājumi parāda nepieciešamību kontrolēt glikoalkaloīdu saturu kartupeļos. Jāpiemin, ka glikoalkaloīdi gan ir termostabili, bet organismā ātri metabolizējas un izvadās no organisma (Tajner–Czopek et al., 2008).

Mūsu eksperimentos uzdevums nebija pētīt audzēšanas apstākļu vai klimata ietekmi uz glikoalkaloīdu līmeni kartupeļos. Mūsu pētījumu mērķis bija noteikt glikoalkaloīdu līmeni vairākās nejauši izvēlētās kartupeļu šķirnēs, imitējot patērētāja ikdienas situāciju, kad kartupeļus nopērk lielveikalos vai tirgū.

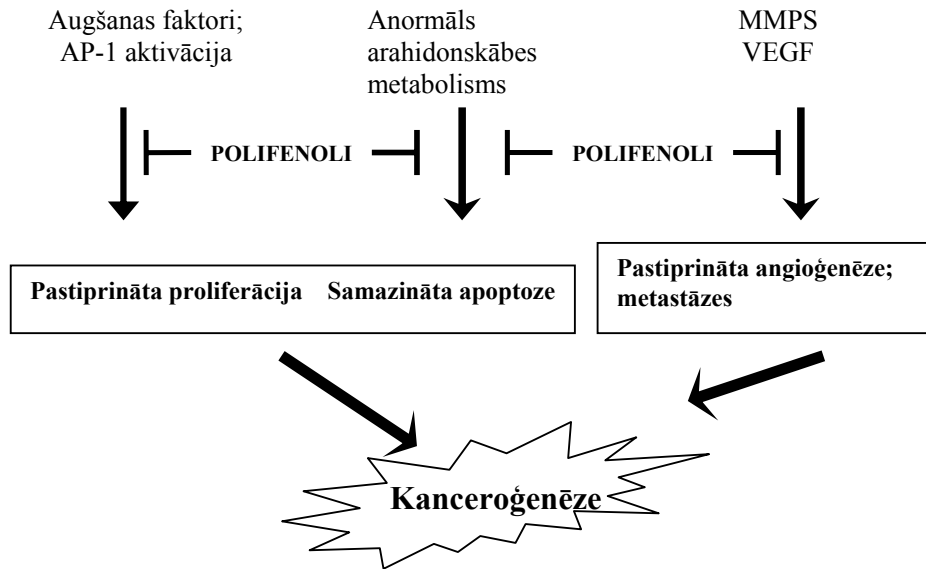
Salīdzinot α -hakonīna un α -solanīna daudzumu, atklājām, ka α -hakonīna daudzums visās kartupeļu šķirnēs ir augstāks kā α -solanīna līmenis. Piemēram, kartupeļu šķirnē „Laura”, kas analizēti bez mizas, α -hakonīna saturs bija apmēram 5 reizes augstāks salīdzinājumā ar α -solanīna daudzumu. Visaugstākais kopējais abu glikoalkaloīdu līmenis kartupeļos, kas analizēti bez mizas, bija šķirnē „Agrie dzeltenie”, bet viszemākais – kartupeļu šķirnē „Borodina”. Kartupeļos, kuri analizēti ar mizu, visaugstākais glikoalkaloīdu līmenis bija šķirnes „Laura” kartupeļos, bet viszemākais – „Mutagēnagrie” šķirnes kartupeļos. Glikoalkaloīdu saturs sulā un blenderētos kartupeļos atšķīrās, bet nevienā gadījumā nepārsniedza atļauto līmeni. Pēc literatūras datiem α -hakonīna un α -solanīna daudzums sastāda 95% no totālā glikoalkaloīdu līmeņa, tāpēc uzskatām, ka mēs neatklājām paaugstinātu totālo glikoalkaloīdu saturu šajās kartupeļu šķirnēs.

5.5. Polifenolu līmenis kartupeļos

Kartupeļu bumbuļos ir dažādu grupu polifenolu savienojumi – antocianīni (augu pigmenti), flavanoni (naringenīns), flavan-3-oli (katehīns, epikatehīns) un arī flavonoli (kamferols, kvercetinā glikozīdi) (Lachman et al., 2000; Cheynier, 2005). Polifenoli ir vieni no augu sekundāriem metabolītiem, kas augos pakāpenisku reakciju rezultātā sintezējas no šikimskābes. Tie pastiprināti sintezējas, lai aizsargātu augus no fotosintētiskā stresa, reaktīvajiem skābekļa veidiem un fitofāģijas (Lamber et al., 2005).

Pētījumos *in vitro* daudzi no polifenoliem uzrāda ietekmi uz signāltransdukcijas ceļiem, kas izraisa šūnu augšanas un transformācijas inhibīciju, pastiprina apoptozi, samazina patogēnu agresīvu uzvedību un palēnina angiogēnēzi (Cheynier, 2005).

Polifenoli izraisa kanceroģenēzes inhibēšanu vairākos ceļos - šūnu augšanas inhibīcijas (Guo et al., 2009) un apoptozes indukcijas (Fresco et al., 2010) vai arahidonskābes metabolisma inhibīcijas (Werz, 2007) veidā.



21. att. Iespējamie polifenolu izraisītie kancerogēnēzes inhibīcijas mehānismi

Mūsu pētījumā neanalizējām, kādi polifenoli ir identificējami kartupeļos, bet noteicām kopējo polifenolu līmeni kartupeļu sulā. Polifenolu saturs tika noteikts par standartvielu lietojot galluskābi un polifenolu saturs kā tas vispārpieņemts tiek izteikts galluskābes ekvivalentos (GSE). Starp dažādām kartupeļu šķirnēm „Bete”, „Sante” un „Brasla” netika novērota atšķirība polifenolu daudzumā, tāpēc salīdzinājumam izmantoti vidējie rādītāji.

Šajā darbā pierādīta triterpēna betulīna saistīšanās pie melanokortīnu un GASS_A receptoriem, kas varētu būt betulīna perifērās un CNS darbības molekulāro darbības mehānismu sastāvdaļa. Darbā novērotā betulīna farmakoloģisko efektu atšķirība no ķīmiski radniecīgajiem savienojumiem betulīnskābes un lupeola parāda iespēju betulīna struktūru izmantot jaunu selektīvu ārstniecisko līdzekļu meklējumos.

Atklātie kartupeļu farmakoloģiskie CNS efekti pēc kartupeļu sulas per os uzņemšanas pelēm un ar GASS un diazepāma atrašanos kartupeļos izskaidrotais kartupeļu sulas pretkrampju darbības mehānisms apstiprina kartupeļu piederību funkcionālajam uzturam.

6. SECINĀJUMI

1. Betulīns selektīvi saistās ar cilvēku melanokortīnu receptoru pirmo apakštipu (MKR1) un antagonizē α -melanocītstimulējošā hormona izraisīto cikliskā adenozinmonofosfāta stimulāciju peļu melanomas B16-F1 šūnās. Betulīns saistās ar visiem melanokortīnu receptoru apakštipiem ar afinitātes rindu: MKR1 > MKR3 > MKR5 > MKR4.
2. Betulīns selektīvi piesaistās pie γ -aminosviestskābes (GASS) saistīšanās vietas GASS_A tipa receptora molekulā peļu smadzeņu šūnās un uzrāda GASS receptora agonista īpašības, kas izpaužas kā pretkrampju darbība, bloķējot GASS_A receptora antagonista bikukulīna efektu. Betulīns nepiesaistās pie benzodiazepīnu saistīšanās vietas GASS_A receptora molekulā.
3. Betulīnskābe un lupeols nesaistās ne ar melanokortīnu, ne ar GASS_A receptoriem.
4. Pierādīta diazepama identitāte kartupeļos, izmērīts un salīdzināts diazepama līmenis kartupeļu sulā un kartupeļu masas ekstraktos ar organiskiem šķīdinātājiem. Diazepams kartupeļu sulā netika atrasts ar AEŠH metodi, bet kartupeļu masas ekstraktos vidēji ir 30 – 45 μ g diazepama uz kg kartupeļu.
5. Kartupeļu sulas bioaktīvie savienojumi konkurē ar benzodiazepīnu saistīšanās vietas iezīmi [³H]flunitrazepamu par saistīšanos ar GASS_A receptoriem. Pēc aprēķinātā diazepama ekvivalenta kartupeļu sulā ir $2,85 \pm 0,52$ ng/ml benzodiazepīnu.
6. Ar AEŠH metodi atklāta GASS kartupeļos un pierādīta kartupeļu sulas konkurence ar iezīmēto GASS par piesaistīšanos pie GASS_A receptora peļu smadzeņu šūnās. Aprēķinot pēc GASS ekvivalenta kartupeļu sula satur 300 ± 56 μ g/ml GASS vai GASS-erģiskas vielas.

7. Izmantojot AEŠH metodi, Latvijā audzētās nejauši izvēlētās piecās kartupeļu šķirnēs izmērītais glikoalkaloīdu saturs liecina, ka nevienā kartupeļu šķirnē nav atklāts augsts glikoalkaloīdu α -solanīna un α -hakonīna līmenis, veicot mērījumus divu gadu (2005. un 2006. g.) ražā. Visaugstākais kopējais glikoalkaloīdu līmenis kartupeļos bez mizas ir šķirnē „Agrie dzeltenie” (2,5 mg/100g), bet viszemākais – kartupeļu šķirnē „Borodina” (0,58 mg/100g).

8. Kopējais polifenolu saturs dažādās šķirnēs nedaudz svārstās, vidēji sastādot $0,095 \pm 0,006$ galluskābes ekvivalentu mg/ ml kartupeļu sulas.

7. PATEICĪBAS

Paldies visiem, kas palīdzējuši šī darba tapšanā gan intelektuāli, gan morāli, gan finansiāli.

Visdziļākā pateicība darba vadītājiem prof. Rutai Muceniecei un Dr.ķīm. Gunāram Tirzītim, kuri neatteicās ievadīt dabas vielu pētījumos un kuru vadībā iesākās mana promocijas darba temata izvēle.

Pateicos Latvijas Organiskās sintēzes institūta β -diketonu laboratorijas darbiniekiem, bet īpaši pateicos LU Medicīnas un Ķīmijas fakultātes docētājiem un doktorantiem, ar kuriem kopā veikta liela daļa eksperimentu un no kuriem mācījos pirmās eksperimentālās farmakoloģijas metodes. Pateicos Dr. farm. Līgai Krīgerei, Dr. biol. Unai Riekstiņai, prof. Vijai Klušai, asoc. prof. Šimonam Svirskim, doktorantiem Kristīnei Vrubļevskai, Jurim Rumakam un Zanei Dzirkalei par konsultācijām, palīdzību un kopīgajām publikācijām.

Pateicos farmācijas maģistrei Ritai Aukštikalnai par bakalaura un maģistra darbu izstrādāšanu par kartupeļu aktīvo vielu pētījumiem un kopīgiem eksperimentiem.

Pateicos hromatogrāfijas speciālistiem LU Ķīmijas fakultātē – Dr.ķīm. Ilvai Nakurtei, Dr.ķīm. Jorenam Kviesim un asoc. prof. Pēterim Mekšam par AEŠH metožu izstrādāšanu un palīdzību eksperimentos.

Īpašu paldies vēlos izteikt Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītājam Dr.farm. Maijai Dambrovai un Rūdolfram Mežapuķem, Olgai Žarkovai, kā arī citiem šīs laboratorijas darbiniekiem, kas palīdzēja veikt radioligandu saistīšanās eksperimentus.

Pateicos LU MF izpilddirektorei Dacei Osītei, sekretārei Jutai Bārtulei, prof. Uldim Vikmanim un dekānei prof. Ingrīdai Rumbai-Rozenfeldei par lielu atbalstu zinātniskā darba veikšanai, dodot iespēju savienot akadēmiskos pienākumus ar promocijas darba izstrādāšanu.

Vislielākā pateicība ESF projektam „**Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē**” Nr. 2009/0138/IDP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/00 par finansiālo atbalstu.

8. Literatūra

1. Abreu P., Relva A., Mattheew S., Gomes Z., Morais Z. High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potatoes from conventional integrated and organic crop systems. *Food Control*, 2007;18:40-44.
2. Aiken Ch., Chen Ch. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends Mol Med*, 2005;11:31-36.
3. Akihisa T., Ogihara J., Kato J., Yasukawa K., Ukiya M., Yamanouchi S., Oishi K. Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transriptase. *Lipids*, 2001;36:507-512.
4. Alakurtti S., Makela T., Koskimies S., Yli-Kauhalouma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci*, 2006;29:1-13.
5. Andre C. M., Ghislain M., Bertin P., Oufir M., Herrera M. R., Hoffmann L., Hausman J. F., Larondelle Y., Evers D. Andean Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a Source of Antioxidant and Mineral Micronutrients. *J Agric Food Chem*, 2007;55 (2):366-378.
6. Andre CM, Schafleitner R, Guignard C, Oufir M, Aliaga CA, Nomberto G, Hoffmann L, Hausman JF, Evers D, Larondelle Y. Modification of the health-promoting value of potato tubers field grown under drought stress: emphasis on dietary antioxidant and glycoalkaloid contents in five native andean cultivars (*Solanum tuberosum* L.). *J Agric Food Chem.*, 2009;57(2):599-609.
7. Anonymous. Committee of experts on Nutrition Food Safety and Consumer's Health (1999a). Ad hoc Group on Functional Food, Council of Europe. 1999a.

8. Anonymous. European Commission Community Research. Project Report: Functional food science in Europe, Volume 1; Functional food science in Europe, Volume 2; Scientific concepts of functional foods in Europe, Volume 3. EUR-18591, Office for Official Publications of the European Communities, L-2985, Luxembourg. 2000.
9. Anonymous. Functional Food Science in Europe. *Br J Nutr*, 1998; 80(1):1-193.
10. Anonymous. ILSI-Europe. The Safety Assessment of Novel Foods. Guidelines prepared by ILSI-Europe novel food task force. Brussels, Belgium: International Life Sciences Institute; 1995.
11. Anonymous. International Food Information Council (IFIC) Foundation. Food for Thought IV Reporting of Diet, Nutrition and Food Safety Executive. 2001 vs. 1999 vs. 1997 vs. 1995, IFIC Foundation, Washington, DC 2002.
12. Anonymous. NBJ's annual industry overview VIII. Functional Foods VI. NBJ, 2003;8:1-9.
13. Anonymous. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *Br J Nutr*, 1999;81(1):1-27.
14. Anonymous. Shopping for Health 2002: Self-Care Perspectives, Vol. 1, Food Marketing Institute and Prevention Magazine, Washington, DC 2002a.
15. Anonymous. World Health Organization (WHO) Solanine and Chaconine. WHO Food Additives Series 30. Geneva. WHO, 1993. Pieejams: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je19.htm>
16. Arai Y., Watanabe S., Kimira M., Mochizuki R., Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr*, 2000; 131 (9):2243-2250.

17. Arnqvist L. Plant sterol metabolism with emphasis on glycoalkaloid biosynthesis in potato(doctor's dissertation). Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Plant Biology and Forest Genetics, 2007, Uppsala, p. 50.
18. Arvanitoyannis IS, Vaitisi O, Mavromatis A. Potato: a comparative study of the effect of cultivars and cultivation conditions and genetic modification on the physico-chemical properties of potato tubers in conjunction with multivariate analysis towards authenticity.Crit Rev Food Sci Nutr, 2008 Oct;48(9):799-823. Review.
19. Ashwell M. Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific basis for all claims. Public Health Nutr, 2001; 4:859-863.
20. Backle M., Ekici P., Leupold G., Coelhan M., Parlar H. Enrichment of the glycoalkaloids a-solanine and a-chaconine from potato juice by Adsorptive Bubble Separation using a pH gradient. J. Sep. Sci, 2004;N 27:1042–1044.
21. Bernard P., Scior T., Didier B., Hibert M., Berthon J.Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. Phytochemistry, 2001; 58:865-874.
22. Bethke PC, Jansky SH. The effects of boiling and leaching on the content of potassium and other minerals in potatoes. J Food Sci. 2008 Jun;73(5):H80-5.
23. Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007 Nov;10(6):724-728.
24. Bidlack W.R., Wang W. Designing functional foods. In Modern Nutrition in Health and Disease, eds Shils M.E., Olson J.A., Shike M. and Ross C.A. Williams & Wilkins, Baltimore, MD 1999; 1823-1833.
25. Blenford D. Food and health. The regulatory position. Int Food Ingred, 1995; 1:35-38.

26. Bouhnik Y., Vahedi K., Achour L., Attar A., Salfati J., Pochart P., Marteau P., Flourie B., Bornet F., Rambaud J.C. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal b Sciifidobacteria in healthy humans. *J Nutr*, 1999; 129:113-116.
27. Bouché N., Fromm H. GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci*, 2004; 9:110-115.
28. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, 1976; 72:248-254.
29. Brown D.A. Skin pigmentation enhancers. *J Photochem Photobiol B*, 2001; 63: 148–161.
30. Cantwell M. A Review of Important Facts about Potato Glycoalkaloids. *Perishables Handling Newsletter*. 1996, N 87. p. 26-27.
31. Camire ME, Kubow S, Donnelly DJ. Potatoes and human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2009;49(10):823-40.
32. Caragay A.B. Cancer-preventative foods and ingredients. *Food Tech*, 1992; 46:65-68.
33. Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M. Targeting mela-nocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev*, 2004; 56: 1–29.
34. Chatterjee S, Srivastava S, Khalid A, Singh N, Sangwan RS, Sidhu OP, Roy R, Khetrapal CL, Tuli R. Comprehensive metabolic fingerprinting of *Withania somnifera* leaf and root extracts. *Phytochemistry*, 2010 Jul;71(10):1085-94.
35. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81 (suppl):223-229.
36. Czerwiecki L. Contemporary view of plant antioxidants role in prevention of civilization diseases. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2009;60(3):201-6.

37. Childs N.M. Functional foods and market entry. *World Ingrid*, 1994; Oct-Nov:36-39 (reviewed in *Perspectives Appl Nutr* 1995; 2:70-71).
38. Chrubasik S, Chrubasik C, Torda T, Madisch A. Efficacy and tolerability of potato juice in dyspeptic patients: a pilot study. *Phytomedicine*, 2006;13(1-2):11-5.
39. Cohen J.F., Kristal R.A., Stanford J.K. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 92:61-68.
40. Committee of experts on Nutrition Food Safety and Consumer's Health (1999). Ad hoc Group on Functional Food, Council of Europe.
41. Cope D.W., Wulf P., Oberto A., Aller M.I., Capogna M., Ferraguti F., et al. Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABA_A receptor γ 2 subunit. *Neuropharmacology*, 2004; 47:17-34.
42. Corsi L., Avallone R., Geminiani E., Cosenza F., Venturini I., Baraldi M. Peripheral benzodiazepines receptors in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 313(1):62-66.
43. Costa B., Salvetti A., Rossi L., Spinetti F., Lena A., Chelli B., Rechichi M., Da Pozzo E., Gremigni V., Martini C. Peripheral benzodiazepine receptor: characterization in human T-lymphoma Jurkat cells. *Mol Pharmacol*, 2006; 69(1):37-44.
44. Dai Y., Luo X. Functional food in China. *Nutr Rev*, 1996; 54:21-23.
45. De Lorenzo M.S., Lorenzano Menna P.L., Alonso D.F., Gomez D.E. In vitro activity of a *Solanum tuberosum* extract against mammary carcinoma cells. *Planta Med*, 2001; 67: 164-166.
46. Deahl K.L., Sinden S.L., Young R.J. Evaluation of wild tuberbearing *Solanum* accessions for foliar glycoalkaloid level and composition. *Am Potato J*, 1993; 70:61-69.

47. DeFelice S.L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Sci Tech*, 1995; 6:59-61.
48. D'Hulst C., Atack J.R., Kooy R.F. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today*, 2009;14(17-18):866-875.
49. Domingo JL. Toxicity studies of genetically modified plants: a review of the published literature. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2007;47(8):721-33.
50. Durst T., Merali Z., Arnason J.T., Sanchez-Vindas E.P., Poveda A.L. Anxiolytic Marcgraviaceae compositions containing betulinic acid, betulinic acid derivatives, and methods. 2002. patent WO/2002/091858.
51. Dwyer J. Six revolutions that will shape the nutrition future. *Nutr Today*, 1999; 34:155-157.
52. Eaton MJ, O. R. Pagán OR, Hann RM, Eterovi VA. Differential effects of dimethyl sulfoxide on nicotinic acetylcholine receptors from mouse muscle and Torpedo electrocytes. *Neuroscience Lett.*,1997; 230:163-166.
53. Edens N.K. Representative components of functional food science. *Nutr Today*, 1999; 34:152-154.
54. Enna S.J., Wood J.H., Snyder S.H. γ -Aminobutyric acid (GABA) in human cerebrospinal fluid: radioreceptor assay. *J Neurochem*, 1977; 28:1121-1124.
55. Esteves – Souza A. Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukemia of alkaloids and flavonoid from two Solanum species. *J Braz Chem Soc*, 2002;13:838-842.
56. Everard J., Cobb E., Cobb A. Effect of temperature on glycoalkaloid and chlorophyll accumulation in potatoes (*Solanum tuberosum* L. Cv. King Edward) stored at low photon flux density, including preliminary modeling using an artificial neural network. *J. Agric. Food Chem.* 1997;N 45:1032 – 1038.

57. European Commission Community Research (2000) Project Report: Functional food science in Europe, Volume 1; Functional food science in Europe, Volume 2; Scientific concepts of functional foods in Europe, Volume 3. EUR-18591, Office for Official Publications of the European Communities, L-2985, Luxembourg.
58. Fresco P, Borges F, Marques MP, Diniz C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Curr Pharm Des.* 2010 Jan;16(1):114-34.
59. Friedman M. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of chromatography. A*, 2004; 1054:143–155.
60. Friedman M, McDonald GM. Postharvest changes in glycoalkaloid content of potatoes. *Adv Exp Med Biol.*, 1999;459:121-43.
61. Frusciante L., Barone A., Carputo D., Ercolano M.R., della Rocca F., Esposito S. Evaluation and use of plant biodiversity for food and pharmaceuticals. *Fitoterapia*, 2000; 71 Suppl.1:66-72.
62. Fulda S., Jeremias I., Steiner H.H., Pietsch T., Debatin K.M. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer*, 1999; 82: 435–441.
63. Functional Food Science in Europe. *BJN*, 1998; 80 (1):1-193.
64. Goldberg I. (ed). *Functional Foods-Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. New York: Chapman & Hall; 1994.
65. Gong Y., Raj K.M., Luscombe C.A., Gadawski I., Tam T., Chu J., et al. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Res*, 2005; 64:127-130.

66. Goro Y., Yukimichi K., Namiki K., Mitsuhiko H., Mitsuo N. Structure of Green Pigment Formed by the reaction of Caffeic Acid Esters (or Chlorogenic acid) with a Primary Amino Compound. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001; 65:2121 – 2130.
67. Guo W, Kong E, Meydani M. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr Cancer*, 2009;61(6):807-10.
68. Hadley M.E., Dorr R.T. Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization. *Peptides*, 2006; 27: 921–930.
69. Hasler C.M. Functional foods: the Western perspective. *Nutr Rev*, 1996;54:6-10.
70. Heinrich M., Barnes J., Williamson E. *Pharmacognosy and phytotherapy*. Churchill Livingstone, Elsevier Science, 2004; 309.
71. Hirai S, Takahashi N, Goto T, Lin S, Uemura T, Yu R, Kawada T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:367838. Epub 2010 May 25.
72. Holopainen I.E., Kivela R., Korpi E.R. Do antiepileptics Phenytoin, Carbamazepamine, and Loreclezole show GABAA receptor subtype selectivity in rat brain sections? *Neurochem Res*, 2001;26:89-94.
73. Holtkamp M., Meierkord H. Biomedicine&diseases:review anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cell Mol Life Sci*, 2000; 64:2023 –2041
74. Huggett A.C., Verschuren P.M. The safety assurance of functional foods. *Nutr Rev*, 1996; 54:132-140.
75. Hunt J.R. Nutritional products for specific health benefits--foods, pharmaceuticals, or something in between? *J Am Diet Assoc*, 1994; 94:151-153.

76. ILSI-Europe. The Safety Assessment of Novel Foods. Guidelines prepared by ILSI-Europe novel food task force. Brussels, Belgium: International Life Sciences Institute, 1995.
77. International Food Information Council (IFIC) Foundation. Food for Thought IV Reporting of Diet, Nutrition and Food Safety Executive. 2001 vs. 1999 vs. 1997 vs. 1995, IFIC Foundation, Washington, DC 2002.
78. Jadhaw S.J., Sharma R.P., and Salunke J.K. Naturally occurring toxic alkaloids in foods. *CRC Crit Rev Toxicol*, 1981; 13:21-103.
79. Jasicka-Misiak I, Lipok J, Swider IA, Kafarski P. Possible fungistatic implications of betulin presence in betulaceae plants and their hymenochaetaceae parasitic fungi. *Z Naturforsch C.*, 2010;65(3-4):201-6.
80. Jensen P.H., Juhler R.K., Nielsen N.J., Hanses T.H. et al Potato glycoalkaloids in soil – optimising liquid chromatography – time – of – flight mass spectrometry for quantitative studies. *Journal of Chromatography. A*, 2008; 1182: 65-71.
81. Jumaa M., Muller B.W. Formulating and stability of benzodiazepines in a new lipid emulsion formulation. *Pharmazie*, 2002; 57:740 –743.
82. Kang X., Xiao J., Huang X., Gu Z. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clin Chim Acta*, 2006; 366: 352-356.
83. Kavvadias D., Mandour A.A., Czygan C.F., Beckmann H., Sand P., Riederer P., Schreier P. Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracunculoides* and *Solanum tuberosum* rationalizing their Endogenous formation in plant tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 269 (1):290-295.
84. Kim T.H., Kim S.H., Lee Y.S., Choi S.Y., Yoo S.Y., Jang J.J. Protective effects of potato extracts and 16,16-dimethyl prostaglandin E2 on the induction of hepatic foci by cotreatment of gamma radiation and diethylnitrosamine. *Anticancer Res*, 1994; 14:1979-1982.

85. Kim YS, Lee YH, Kim HS, Kim MS, Hahn KW, Ko JH, Joung H, Jeon JH. Development of patatin knockdown potato tubers using RNA interference (RNAi) technology, for the production of human-therapeutic glycoproteins. *BMC Biotechnol*, 2008;8:36-37.
86. Kinnersley A.M., Turano F.J., Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2000; 19:479–509.
87. Knaggs, AR. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports*, 2001;18 (3):334–55.
88. Klusa V., Kiiivet R.A., Muceniece R., Liepa I., Harro J., Svirskis S., et al. Thymopentin antagonizes stress-induced changes of GABA/benzodiazepine receptor complex. *Reg Peptides*, 1990; 27:355-365.
89. Korpan Y.I., Nazarenko E.A., Skryshevskaya I.V., Martelet C. Potato glycoalkaloids: true safety or false sense of security? *Trends Biotechnol*, 2004; 22 , No.3:147-151.
90. Krasowski M.D., McGehee D.S., Moss J. Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions. *Can J Anaesth*, 1997;44 (5): 525-534.
91. Lachman J., Hamouz K., Orsak M., Pivec V. Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition – review. *Series Rostlinna Vyroba*, 2001;47 (4):181-191.
92. Lacombe B., Becker D., Hedrich R., DeSalle R., Hollmann M., Kwak J.M., Schroeder J.I., Le Novère N., Nam H.G., Spalding E.P., Tester M., Turano F.J., Chiu J., Coruzzi G. The identity of plant glutamate receptors. *Science*, 2001; 292: 1486-1487.
93. Lambert J. D., Hong J., Liao J. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81:2845-2919.
94. Laurila J., Laakso I., Väänänen T., Kuronen P., Huopalahti R., Pehu E. Determination of solanidine and tomatidine type glycoalkaloid aglycons by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric Food Chem.* 1999;47:2738 - 2742.

95. Lee K., Kozukue N., Han J., Park J., Chang E., Baek E., Chang J., Friedman M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J Agric Food Chem*, 2004;52:2832-2839.
96. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem*, 2003;51(25):7292-7295.
97. Lee M.H., Cheng J.J., Lin C.Y., Chen Y.J., Lu M.K. Precursor – feeding strategy for the production of solanine, solanidine and solasodine by a cell culture of *Solanum Lyratum*. *Process Biochemistry*, 2007;42:899-903.
98. Li P., Lo Brutto R., Kazakevich Y.V. Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 2004;1049: 63-73.
99. Lister C.E., J Munro J. Nutrition and health qualities of potatoes – a future focus. *Crop & Food Research Confidential Report No. 143 March 2000*
Available from:
http://www.vegetables.co.nz/resources/crop_foodreport_potatoes.pdf. Atvērts 2009.g. 28.dec.
100. Liu Y.W., Han C.H., Lee M.H., Hsu F.L., Hou W.C. Patatin, the tuber storage protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) exhibits antioxidant activity in vitro. *J Agric Food Chem*, 2003; 51:4389-4393.
101. Loake G, Grant M. Salicylic acid in plant defence--the players and antagonists. *Curr Opin Plant Biol*. 2007;10(5):466-72.
102. Macdonald C, Lyzenga W, Shao D, Agu RU. Water-soluble organic solubilizers for in vitro drug delivery studies with respiratory epithelial cells: Selection based on various toxicity indicators. *Drug Deliv*. 2010 Apr 30. [Epub ahead of print].

103. Machado R.M.D., Toledo M.C.F, Garcia L.C. Effect of light and temperature on the formation of glycoalkaloids in potato tubers. *Food Control*, 2007;18: 503–508.
104. Maga J.A. Potato alkaloids. *Crit Rev Toxicol*, 1980;12:371-405.
105. Mas J.S., Gerritsen I., Hahmann C., Jimenez-Cervantes C., Garcia-Borron J.C. Rate limiting factors in melanocortin 1 receptor signalling through the cAMP pathway. *Pigment Cell Res*, 2003; 16:540–547.
106. McCue K.F., Shepherd L.V.T., Allen P.V., Maccree M.M., Rockhold D.R. Metabolic compensation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in transgenic potato tubers: using reverse genetics to confirm the in vivo enzyme function of a steroidal alkaloid galactosyltransferase. *Plant Sci.*, 2005;168:267–273.
107. McGehee D.S., Matthew Ph., Krasowski D. Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurinum metabolism. *Anesthesiology*, 2000;93:510 – 519.
108. Mehta A.K., Ticku M.K. Unsulfated and sulphated neurosteroids differentially modulate the binding characteristics of various radioligands of GABA_A receptors following chronic ethanol administration. *Neuropharmacology*, 2001; 40:668-675.
109. Mensinga T.T., Sips A.J., Rompelberg C.J., van Twillert K., Meulenbelt J., van den Top H.J., van Egmond H.P. Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2005; 41:66-72.
110. Messina M., Messina V. Provisional recommended soy protein and isoflavone intakes for healthy adults. *Nutr Today*, 2003; 38:100-109.
111. Messina M, Hilakivi-Clarke L Early intake appears to be the key to the proposed protective effects of soy intake against breast cancer. *Nutr Cancer*. 2009;61(6):792-8.

112. Milner J.A. Biomarkers for evaluating benefits of functional foods. *Nutr Today*, 1999; 34:146-149.
113. Muceniece R., Saleniece Kr., Krigere L., Rumaks J., Dzirkale Z., Mezhapuke R., Kviesis J., Mekss P., Klusa V., Schioth H.B., Dambrova M. Potato (*Solanum tuberosum*) juice exerts an anticonvulsant effect in mice through binding to GABA receptors. *Planta Med.* 2008 Apr;74(5):491-496.
114. Muceniece R., Saleniece Kr., Rumaks J., Krigere L., Dzirkale Z., Mezhapuke R., Zharkova O., Klusa V. Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;90:712-716.
115. Nakamura K., Nara K., Noguchi T., Oshiro T., Koga H. Contents of gamma-aminobutyric acid (GABA) in potatoes and proceed potato products. *J Jap. Soc. Food Sci. Technol*, 2006; 53:514–517.
116. NBJ's annual industry overview VIII. Functional Foods VI. *Nutr Bus J* 2003; 8:1-9.
117. Noguchi T., Nakamura K., Nagai T. Antihypertensive effects of GABA-enriched potato snacks in spontaneously hypertensive rats. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol*, 2007; 54:75–81.
118. Nordstedt C., Fredholm B.B. A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatants and body fluid. *Anal Biochem*, 1990;189(2):231-234.
119. Okura T, Ibe M, Umegaki K, Shinozuka K, Yamada S. Effects of dietary ingredients on function and expression of P-glycoprotein in human intestinal epithelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(2):255-9.
120. Panina IaS., Vasiukova N.I., Ozeretskovskaia O.L. Free and conjugated forms of salicylic acid: content and role in potato. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*, 2005; 41:354-357.

121. Panovska Z., Hajslova J., Kosinkova P., Cepl J. Glykoalkalioid content of potatoes sold in Czechia. *Nahrung*, 1997; 41:146-149.
122. Pariza M.W. Functional foods: Technology, functionality and health benefits. *Nutr Today*, 1999; 34:150-151.
123. Parr A.J., Mellon F.A., Colquhoun I.J., Davies H.V. Dihydrocaffeoyl polyamines (kukoamine and allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling. *J Agric Food Chem*, 2005; 53:5461-5466.
124. Pascal G. Functional foods in the European Union. *Nutr Rev*, 1996;54 (suppl):29-32.
125. Patel B., Schutte R., Sporns P., Doyle J., Jewel L., Fedorak R.N. Potato glycoalkaloids adversely affect intestinal permeability and aggravate inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2002;8(5): 340–346.
126. Patočka I. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J Appl Biomed*, 2003; 1:7-12.
127. Pateraki I, Kanellis AK. Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Cell Rep*. 2010;29(6):629-41.
128. Pezzuto J.M. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos*, 1999; 20:379-83.
129. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedere T.E., Farmsworth N.R., Cordell G., et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med*, 1995; 1:1046-1051.
130. Qi W, Ding D, Salvi RJ Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear oorganotypic cultures. *Hear Res*. 2008 Feb;236(1-2):52-60.
131. Rigg A. Cadmium and glycoalkaloids in raw potatoes. *ACT Health. Food Survey Reports* 1996-97.

131. Roberfroid M. B. Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *Am J Clin Nutr*, 2000; 71:1660-1664.
132. Roberfroid M.B. Prebiotics and synbiotics: Concepts and nutritional properties. *BJN*, 1998; 80:197-202.
133. Roberts D.W., Newton R.A., Beaumont K.A., Leonard J.H., Sturm R.A. Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures. *Pigment Cell Res*, 2006; 19:76–89.
134. Rodríguez Rodríguez E, Darías Martín J, Díaz Romero C. Aloe vera as a functional ingredient in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010 Apr;50(4):305-26. Review.
135. San I.C., Wang H.K., Kashiwada Y., Shen J.K., Cosentino L.M., Chen C.H., et al. Anti AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J Med Chem*, 1998; 41:4648-4657.
136. Sánchez G, Gerhardt N, Siciliano F, Vojnov A, Malcuit I, Marano MR Salicylic acid is involved in the Nb-mediated defense responses to Potato virus X in *Solanum tuberosum*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2010;23(4):394-405.
137. Santos RC, Salvador JA, Marín S, Cascante M, Moreira JN, Dinis TC Synthesis and structure-activity relationship study of novel cytotoxic carbamate and N-acylheterocyclic bearing derivatives of betulin and betulinic acid. *Bioorg Med Chem*. 2010 Apr 29. [Epub ahead of print].
138. Santos RC, Salvador JA, Marín S, Cascante M Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem*. 2009 Sep 1;17(17):6241-50.
139. Sanders M.E. Probiotics. A publication of the Institute of Food Technologists' expert panel on food safety and nutrition. *Food Technol*, 1999; 53:67-77.

140. Sangameswaran L., Falles H. M., Friedrich P., De Blas A. L. Purification of a benzodiazepines from brain and detection of benzodiazepines-like immunoreactivity in human brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83:9236-9240.
141. Schioth H.B., Muceniece R., Larsson M., Mutulis F., Szardenings M., Prusis P., Lindeberg G., Wikberg J.E. Binding of cyclic and linear MSH core peptides to melanocortin receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, 1997; 319:369-373.
142. Schioth H.B., Muceniece R., Wikberg J.E., Chhajlani V. Characterisation of melanocortin receptor subtypes by radioligand binding analysis. *Eur J Pharmacol*, 1995; 288: 311-317.
143. Schioth H., Muceniece R., Wikberg J.E.S. Characterisation of melanocortin 4 receptor by radioligand binding analysis. *Pharmacol Toxicol*, 1996; 79:161-165.
144. Schmidt M.L., Kuzmanoff K.L., Ling-Indeck L., Pezzuto J.M. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer*, 1997; 33:2007-2010.
145. Shewry PR. Tuber storage proteins. *Ann Bot*. 2003;91(7):755-69.
146. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *Br J Nutr*, 1999; 81(1):1-27.
147. Selzer E., Pimentel E., Wacheck V., Schlegel W., Pehamberger H., Jansen B. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 2000;114:935-940.
148. Shiroma-Kian C, Tay D, Manrique I, **Giusti MM**, Rodriguez-Saona LE. Improving the screening process for the selection of potato breeding lines with enhanced polyphenolics content. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(21):9835-9842.
149. Shopping for Health 2002: Self-Care Perspectives, Vol. 1, Food Marketing Institute and Prevention Magazine, Washington, DC 2002.

150. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela – Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999;299:152-178.
151. Sloan A.E. The top 10 functional food trends: The next generation. *Food Technol*, 2002; 56:32-57.
152. Steinhof B.V., Lotz M., Ulber R., Kasper C., Scheper T. Optimization of glycoalkaloid analysis for use in industrial potato fruit juice downstreaming. *Eng Life Sci*, 2005; 5:562 – 567.
153. Tajner – Czopek A., Jarych – Szyszka M., Lisinska G. Changes in glycoalkaloids content of potatoes destined for consumption. *Food Chem*, 2008; 106:706-711.
154. Tan Y., Rong Y., Pezzuto J.M. Betulinic acid-induced pro-programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin Cancer Res*, 2003; 9:2866–2875.
155. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol.* 2010 May 11. [Epub ahead of print].
156. Tomoskozi – Farkas R., Daood H.G., Polgar Zs., Hajos Gy. Determination of glycoalkaloids in Hungarian potatoes by HPLC. *Chromatographia Suppl*, 2006; 63:115–118.
157. Udeani GO, Zhao GM, Shin YG, Cooke BP, Graham J, Beecher CWW, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos* 1999;20:379-383.
158. Vaananen T. Glycoalkaloid content and starch structure in Solanum Species and interspecific Somatic Potato hybrids (dissertation) – University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, 2007; p. 79.

159. Wexler E.M., Stanton P.K., Nawy S. Nitric oxide depresses GABAA receptor function via coactivation of cGMP-dependent kinase and phosphodiesterase. *J Neurosci*, 1998; 18:234-239.
160. Veeraputhiran M, Theus JW, Pesek G, Barlogie B, Cottler-Fox M. Viability and engraftment of hematopoietic progenitor cells after long-term cryopreservation: effect of diagnosis and percentage dimethyl sulfoxide concentration. *Cytotherapy*. 2010 Mar 30. [Epub ahead of print].
161. Vignolo L., Cupello A., Mainardi P., Rapallino M. V., Patrone A., Loeb C. Accumulation of labeled gamma-aminobutyric acid rat brain and brain synaptosomes after i.p. injection. *Neurochem Res*, 1992; 17:193-199.
162. Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2008;45: 1205–1216.
163. Wikberg J.E.S., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., Skottner A. New aspects on the melanocortin and their receptors. *Pharmacol. Res*, 2000;42: 393-420.
164. Wildmann J. Increase of natural benzodiazepines in wheat and Potato during germination. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 157:1436-1443.
165. Wildmann J., Vetter W., Ranalder U.B., Schmidt K., Maurer R., Mohler H. Occurrence of pharmacologically active benzodiazepines in trace amounts in wheat and potato. *Biochem Pharmacol*, 1988; 37 (19):3549-3559.
166. Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S. Medicinal use of potato-derived products: a systematic review. *Phytother Res*. 2010;24(2):159-62.
167. Werz O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med*. 2007;73(13):1331-57.

168. Yamashita K., Lu H., Lu J., Chen G., Yokoyama T., Sagara Y., et al. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin Chim Acta*, 2002; 325:91-96.
169. Yu D., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. New development in natural products-based anti-AIDS research. *Med Res Rev*, 2007; 27:108-132.
170. Zarzecka K., Gugala M. Changes in the content of glycoalkaloids in potato tubers according to soil tillage and weed control methods. *Plant Soil Environ*, 2007; 53 (6):247–251.
171. Zdzisinska B., Rzeski W., Paduch R., Szuster-Ciesielska A., Kaczor J., Wejksza K., Kandefler-Szerszen M. Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Polish J Pharmacol*, 2003; 55:235-238.
172. Zhang Y, Zhou L, Bao YL, Wu Y, Yu CL, Huang YX, Sun Y, Zheng LH, Li YX. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chem Biol Interact*. 2010;185(3):174-81.
173. Zhu M., Phillipson J.D., Greengrass P.M., Bowery N.G. Chemical and biological investigation of the root bark of *Clerodendrum mandarinorum*. *Planta Med*, 1996; 62:393-396.
174. Zuco V., Supino R., Righetti S.C. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett*, 2002; 175:17–25.