

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Romana GLAVAN

**VLOGA CITOSOLNE IN MITOHONDRIJSKE
SUPEROKSID DISMUTAZE V CELICAH
KVASOVKE S SPREMENJENIM OKSIDACIJSKIM
STANJEM**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Romana GLAVAN

**VLOGA CITOSOLNE IN MITOHONDRIJSKE SUPEROKSID
DISMUTAZE V CELICAH KVASOVKE S SPREMENJENIM
OKSIDACIJKIM STANJEM**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**THE ROLE OF CYTOSOLIC AND MITOCHONDRIAL
SUPEROXIDE DISMUTASE IN YEASTS CELLS WITH CHANGED
OXIDISED STATUS**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes – Field: Biotechnology

Ljubljana, 2015

V ljube in hvaležen spomin na staro mamo Emílijo

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Biotehnologija. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila za mentorico imenovana izr. prof. dr. Polona Jamnik, za recenzenta pa izr. prof. dr. Blaž Cigi .

Mentorica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK

Recenzent: izr. prof. dr. Blaž CIGI

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

lanica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

lan: izr. prof. dr. Blaž CIGI
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Romana GLAVAN

KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 577.1:602.3:582.282.23(043)=163.6
KG antioksidanti/kvercetin/askorbinska kislina/oksidativni stres/kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*/encimi/superoksid dismutaza/specifi na aktivnost SOD
AV GLAVAN, Romana, dipl. bioteh. (UN)
SA JAMNIK, Polona (mentorica)/CIGI, Blaž (recenzent)
KZ SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN VLOGA CITOSOLNE IN MITOHONDRIJSKE SUPEROKSID DISMUTAZE V CELICAH KVASOVKE S SPREMENJENIM OKSIDACIJSKIM STANJEM
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP XII, 61 str., 2 pregl., 16 sl., 3 pril., 167 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Delovanje antioksidantov je zadnje ase zelo preu evano. Poznamo eksogene in endogene antioksidante. Vedno ve raziskav poro a o delovanju in vplivu eksogenih antioksidantov na endogene antioksidativne obrambne sisteme. Tudi nas je v okviru magistrskega dela zanimal vpliv predtretiranja celic kvasovke *S. cerevisiae* s kvercetinom in askorbinsko kislino in naknadne izpostavitve menadionu na aktivnost citosolne (Cu-Zn SOD) in mitohondrijske (Mn SOD) superoksid dismutaze. Kulturo kvasovk smo najprej namnožili v gojiš u YEPD do stacionarne faze rasti (60-h kultivacija), zatem inkubirali v pufru PBS 96 h in nato predtretirali celice 4 oz. 24 h z dvema koncentracijama kvercetina (0,05 in 0,117 g/L) in askorbinske kisline (20 in 40 mM) ter naknadno izpostavili menadionu za 2 h. Kot primerjavo smo vzeli kulturo celic, ki ni bila predtretirana, vendar samo izpostavljena menadionu. Menadion smo uporabili kot oksidant. Z razbijanjem celic in diferencialno detergentno frakcionacijo ter centrifugiranjem smo nato izolirali citosolno in mitohondrijsko frakcijo, kjer smo s pomo jo komercialnega kompleta merili aktivnost posameznih SOD. Za izra un specifi ne aktivnosti SOD smo dolo ili še koncentracijo izoliranih proteinov po metodi Bradford. Rezultati so pokazali, da izpostavitev celic samo menadionu pove a aktivnost Mn SOD v primerjavi s kontrolo, medtem ko nima vpliva na aktivnost Cu-Zn SOD. Predtretiranje celic s kvercetinom in naknadna izpostavitev menadionu pove a aktivnost Mn SOD v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana, na Cu-Zn SOD pa nima vpliva, medtem ko predtretiranje z askorbinsko kislino pove a aktivnost Cu-Zn SOD, aktivnost Mn SOD pa se ne spremeni. Vpliv obeh antioksidantov je koncentracijsko odvisen. as predtretiranja (4 oz. 24 h) z antioksidantoma se ni izkazal kot pomemben dejavnik vpliva na aktivnost tako Cu-Zn kot Mn SOD. Rezultati nakazujejo, da se Mn SOD bolj odziva na kvercetin, Cu-Zn SOD pa bolj na askorbinsko kislino.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 577.1:602.3:582.282.23(043)=163.6
CX antioxidants /quercetine/ascorbic acid/oxidative stress/yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/enzymes/superoksid dismutase/specific SOD activity
AU GLAVAN, Romana, dipl. bioteh. (UN)
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/CIGI, Blaž (reviewer)
PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI THE ROLE OF CYTOSOLIC AND MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE
DISMUTASE IN YEASTS CELLS WITH CHANGED OXIDISED STATUS
DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes – Field: Biotechnology)
NO XII, 61 p., 2 tab., 16 fig., 3 ann., 167 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Action of antioxidants is intensively studied. There are exogenous and endogenous antioxidants. A growing number of research reports on the functioning and the impact of exogenous antioxidants on the endogenous antioxidant defence systems. In the framework of the master's thesis we were interested in the impact of pre-treating yeast cells *S. cerevisiae* with quercetin and ascorbic acid and subsequent exposure of the menadione on the activity of cytosolic (Cu-Zn SOD) and mitochondrial (Mn SOD) superoxide dismutase. Yeast culture was first cultivated in YEPD medium to the stationary growth phase (60-h cultivation) and then incubated in a PBS buffer for 96 h followed by pre-treatment of cells for 4 or 24 h with two concentrations of quercetin (0.05 and 0.117 g/L) and ascorbic acid (20 and 40 mM), and subsequently exposed to menadione for 2 h. As a comparison, we took the cell culture which was not pre-treated, but only exposed to menadione. Menadione was used as an oxidant. Cytosolic and mitochondrial fractions were isolated by cell disruption, differential detergent fractionation and centrifugation. Specific activities of SOD were measured using a commercial kit. For calculation of specific activity of SOD we determined the concentration of isolated proteins according to the Bradford method. The results showed that exposure of cells only to menadione increases the activity of Mn SOD in comparison with the control, while there is no effect on the activity of the Cu-Zn SOD. Pre-treatment of cells with quercetin and subsequent exposure to menadione increase the activity of Mn SOD compared to the culture which was not pre-treated, while the activity of Cu-Zn SOD is not affected. On the other hand pre-treatment of cells with ascorbic acid increases the activity of the Cu-Zn SOD, activity of Mn SOD is not changed. The influence of both antioxidants is a concentration-dependent. Pre-treated time (4 or 24 h) with antioxidants is not proven to be an important factor which affects the activity of both SOD. The results indicate that the Mn SOD is more responsive to quercetin, while ascorbic acid has more impact on Cu-Zn SOD.

KAZALO VSEBINE

KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI MAGISTRSKEGA DELA.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KVASOVKE IN OKSIDATIVNI STRES.....	3
2.1.2 Oksidativni stres.....	3
2.1.3 Mitohondriji kot glavni vir ROS.....	5
2.1.4 Poškodbe nastale kot posledica oksidativnega stresa.....	7
2.1.4.2 Oksidacija proteinov	8
2.1.4.3 Peroksidacija lipidov	8
2.2 ANTIOKSIDANTI.....	8
2.2.1 Endogena antioksidativna obramba.....	8
2.2.1.1 Encimska obramba	9
2.2.1.2 Neencimska obramba	13
2.2.2 Eksogena antioksidativna obramba.....	13
3 MATERIAL IN METODE.....	17
3.1 POTEK PRAKTI NEGA DELA	17
3.2 MATERIALI.....	18
3.2.1 Delovni mikroorganizem	18
3.2.2 Priprava trdnega YEPD gojiš a in precepljanje kulture	18
3.2.3 Priprava teko ega YEPD gojiš a in inokulacija kulture	18
3.2.4 Priprava PBS pufra (ang. <i>Phosphate Buffer Saline</i>) in prenos kulture.....	19
3.2.5 Priprava založnih raztopin kvercetina, askorbinske kisline in menadiona	19
3.2.6 Izpostavitev kulture <i>Saccharomyces cerevisiae</i> askorbinski kislini, kvercetin in naknadna izpostavitev menadionu.....	20
3.2.7 Pobiranje tretiranih vzorcev in zamrzovanje kulture v teko em dušiku.....	21
3.2.8 Izolacija citosolnih in mitohondrijskih proteinov	21
3.2.9 Merjenje koncentracije proteinov v citosolni in mitohondrijski frakciji (metoda po Bradfordu)	21
3.2.10 Merjenje aktivnosti citosolne (Cu-Zn) in mitohondrijske (Mn) superoksid dismutaze (SOD).....	22
3.3 METODE	22
3.3.1 Priprava trdnega YEPD gojiš a in precepljanje delovne kulture	22

3.3.2	Priprava tekočega YEPD gojišča, steklovine in inokulacija.....	22
3.3.3	Priprava PBS pufra in prenos kulture vanj.....	23
3.3.4	Priprava založnih raztopin antioksidantov in oksidanta menadiona.....	23
3.3.5	Izpostavitve kulture askorbinski kislini, kvercetin in naknadna izpostavitve menadionu.....	24
3.3.6	Pobiranje vzorcev in zamrzovanje v tekočem dušiku.....	24
3.3.7	Izolacija citosolnih in mitohondrijskih proteinov.....	24
3.3.8	Merjenje koncentracije proteinov v citosolni in mitohondrijski frakciji (metoda po Bradfordu).....	25
3.3.9	Merjenje aktivnosti citosolne (Cu-Zn) in mitohondrijske (Mn) superoksid dismutaze (SOD).....	26
3.3.10	Obdelava rezultatov.....	27
4	REZULTATI	30
4.1	PREUČEVANJE VPLIVA PREDTRETIRANJA S KVERCETINOM NA AKTIVNOST SOD.....	31
4.1.1	Vpliv na aktivnost Mn SOD.....	31
4.1.2	Vpliv na aktivnost Cu-Zn SOD.....	33
4.2	PREUČEVANJE VPLIVA PREDTRETIRANJA Z ASKORBINSKO KISLINO NA AKTIVNOST SOD.....	34
4.2.1	Vpliv na aktivnost Mn SOD.....	34
4.2.2	Vpliv na aktivnost Cu-Zn SOD.....	36
4.3	ASOVNA PRIMERJAVA PREDTRETIRANJ Z ANTIOKSIDANTOMA.....	38
4.3.1	Vpliv askorba na Mn SOD pri predtretiranju s kvercetinom.....	38
4.3.2	Vpliv askorba na Cu-Zn SOD pri predtretiranju s kvercetinom.....	38
4.3.3	Vpliv askorba na Mn SOD pri predtretiranju z askorbinsko kislino.....	39
4.3.4	Vpliv askorba na Cu-Zn SOD pri predtretiranju z askorbinsko kislino.....	40
5	RAZPRAVA	40
6	SKLEPI	44
7	POVZETEK	45
8	VIRI	47
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primarni endogeni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Walker, 1998; Zakrajšek, 2014).....	9
Preglednica 2: Postopek nanašanja komponent na mikrotitrsko ploščo za določanje aktivnosti SOD.....	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Mesta nastanka ROS v mitohondrijski dihalni verigi (Krishnendu in sod., 2013).	6
Slika 2: Prikaz encimske antioksidativne obrambe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Herrero in sod., 2007).	11
Slika 3: Molekularna struktura kvercetina (Chen in sod., 2010)	14
Slika 4: Shema poteka prakti nega dela magistrske naloge	17
Slika 5: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).	31
Slika 6: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).	32
Slika 7: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).	33
Slika 8: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).	33
Slika 9: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama askorbinske kisline (AA_1 in AA_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).	34
Slika 10: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama askorbinske kisline (AA_1 in AA_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).	35
Slika 11: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama askorbinske kisline (AA_1 in AA_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).	36
Slika 12: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema razli nima koncentracijama askorbinske kisline (AA_1 in AA_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).	36
Slika 13: Vpliv asa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> z dvema razli nima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD.	38

- Slika 14: Vpliv asa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke *S. cerevisiae* z dvema različnima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD..... 38
- Slika 15: Vpliv asa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke *S. cerevisiae* z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA_1 in AA_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD..... 39
- Slika 16: Vpliv asa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke *S. cerevisiae* z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA_1 in AA_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD. 40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov

Priloga B: Preglednica z absolutnimi vrednostmi specifične aktivnosti Mn SOD

Priloga C: Preglednica z absolutnimi vrednostmi specifične aktivnosti Cu-Zn SOD

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AA	askorbinska kislina
CAT	katalaza
CP	citosolni ekstrakcijski pufer
CP ⁺	1 x citosolni ekstrakcijski pufer z dodanim inhibitorjem proteaz in ditionitrolom
Cu-Zn SOD	baker in cink vsebujo a superoksid dismutaza
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	ditionitrol (angl. <i>dithionitrol</i>)
GPX	glutation peroksidaza
GSH	reducirana oblika glutationa
GSQ	glutationil kvercetin
HOO	hidroperoksilni ali perhidroksilni radikal
IP	inhibitor proteaz
Ipd.	in podobno
Itd.	in tako dalje
LDL	lipoprotein z majhno gostoto (angl. <i>low density lipoprotein</i>)
M	menadion
Mn SOD	mangan vsebujo a superoksid dismutaza
MP	mitohondrijski ekstrakcijski pufer
MP ⁺	mitohondrijski ekstrakcijski pufer z dodanim inhibitorjem proteaz in ditionitrolom
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMM	notranja mitohondrijska membrana
O ₂ ⁻	superoksidni anionski radikal (angl. <i>superoxide anion</i>)
Obr./min	obrati na minuto
OD	opti na gostota (angl. <i>optical density</i>)
OH	hidroksilni radikal (angl. <i>hydroxyl radical</i>)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
Q	kvercetin
QQ	kvercetin kinon
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (angl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
ROO	peroksilni radikali (angl. <i>peroxyl radicals</i>)
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SOD	superoksid dismutaza (angl. <i>superoxide dismutase</i>)
WST-1	vodotopna tetrazolijeva sol (angl. <i>water-soluble tetrazolium salt</i>)
YEPD	gojiš e s kvasnim ekstraktom, peptonom in dekstrozo (angl. <i>yeast extract peptone dextrose growth medium</i>)
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov, BF, Ljubljana
ZMM	zunanja mitohondrijska membrana

1 UVOD

Med normalnim aerobnim metabolizmom nastaja širok spekter kisikovih radikalov in drugih reaktivnih kisikovih zvrsti (angl. *reactive oxygen species* - ROS). Ti se razgrajujejo z različnimi antioksidativnimi obrambami, ki se bodisi sintetizirajo endogeno (v lastnem organizmu) bodisi je eksogeno dodana s prehrano. Namen antioksidativne obrambne mreže ni, da odstrani vse ROS, temveč, da nadzira njihovo raven in tako omogoči uporabne funkcije z minimalnimi oksidativnimi poškodbami. Mnogi znanstveniki se sprašujejo, kako pomembni so antioksidanti, kot sta vitamin C in E, ki prideta iz hrane. Na splošno velja, da povečano uživanje teh vitaminov ne zmanjša ravni oksidativnih poškodb drastično, če sploh, pri ljudeh, ki se sicer že prehranjujejo s priporočenimi dnevnimi vnosi hranil (Halliwell in Gutteridge, 2007).

Superoksidni anion (O_2^-) je poznan kot potencialno nevaren stranski produkt aerobnega metabolizma v vseh aerobnih organizmih. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* in tudi vse eukariote vsebujejo dva tipa superoksid dismutaz: manganovo in baker-cinkovo superoksid dismutazo (Lushchak in sod., 2005).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Flavonoidi (med njimi kvercetin) in tudi vitamin C so antioksidanti, kar pomeni, da naj bi zmanjševali oksidativni stres z lovljenjem prostih kisikovih radikalov. To so potrdili številni znanstveniki v svojih raziskovalnih delih. Vendar so nekateri znanstveniki v zadnjem času odkrili, da lahko nekateri polifenoli delujejo tudi kot pro-oksidanti, kar pomeni, da naj bi bili toksični *in vivo*, ker naj bi povečali stopnjo oksidativnih poškodb v celicah in s tem povečali oksidativni stres. Vendar gledano drugače, so s tem na nek način dosegli eno mere koristni, kajti če s svojim prooksidativnim delovanjem blago povečajo stopnjo oksidacije, potem predvidevajo, da se naj bi posledično povečala tudi telesna lastna antioksidativna obramba oz. drugače povedano, naj bi s tem spodbudili in okrepili delovanje endogenih antioksidantov in antioksidativnih sistemov ter izražanje različnih biotransformacijskih encimov v celici. Vse to pa naj bi posredno vodilo do zaščite celic pred oksidativnim stresom. Ali naj bi eksogeni flavonoidi in ostali antioksidanti delovali anti- ali prooksidativno v celicah, je težko potrditi. Ključni problem je, da je to dokaj slabo raziskano področje in bi bilo potrebno v prihodnosti na tem področju še veliko preučiti (Procházková, Boušová et al. 2011), (Halliwell 2008). Naš namen je preveriti vpliv kvercetina in askorbinske kisline in naknadne izpostavitve menadiona na delovanje oziroma aktivnost enega izmed endogenih antioksidativnih sistemov – superoksid dismutaze (SOD), pri čemer se bomo usmerili na citosolno (Cu-Zn) in mitohondrijsko (Mn) SOD, in sicer na modelnem organizmu *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA

- preveriti vpliv predtretiranja celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* s kvercetinom ali askorbinsko kislino in naknadne izpostavitve menadionu na aktivnost citosolne (Cu-Zn SOD) in mitohondrijske (Mn SOD) superoksid dismutaze

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pri akujemo da:

- se bosta aktivnosti Cu/Zn SOD in Mn SOD med seboj razlikovali v primeru predtretiranja celic s posameznim antioksidantom
- se bo predtretiranje celic s kvercetinom druga e odrazilo na ravni Cu-Zn SOD in Mn SOD kot predtretiranje z askorbinsko kislino

2 PREGLED OBJAV

2.1 KVASOVKE IN OKSIDATIVNI STRES

2.1.1 Kvasovke kot pogosto uporabljeni modelni organizem pri študijah oksidativnega stresa

Kvasovke so najenostavnejši evkariontski organizmi in imajo ohranjenih veliko esencialnih procesov, ki so skupni tudi ljudem, zato so zelo pogosto uporabne kot modelni organizmi (Müller in Grossniklaus, 2010) in sicer tudi za študij raznih okoljskih stresov, med drugim oksidativnega stresa (Zakrajšek in sod., 2011). Gledano s tehničnega aspekta imajo kvasne celice v primerjavi s loveškimi celicami kar nekaj prednosti: dobro so prilagojene in odporne na visokozmogljivostne eksperimentalne metode, imajo kratek podvojevalni čas, rastejo lahko bodisi v tekočih suspenzijah bodisi na trdnih gojiščih v obliki kolonij, poleg tega ne zahtevajo strogo sterilnih pogojev in tehnik, niti dragih kompleksnih gojišč (Guthrie in Fink, 1991). Med kvasovkami je za številne študije najpogosteje kot modelni organizem uporabna *Saccharomyces cerevisiae*. V stacionarni fazi rasti je še posebno uporabna za študij oksidativnega stresa, staranja in apoptoze, kajti v tej fazi so kvasne celice podobne večinoma celicam drugih organizmov na več ravneh: večinoma energije pridobijo s pomočjo mitohondrijskega dihanja, celice so v G₀ fazi mitoze, napake in poškodbe se v tej fazi kopirajo s taktično (Longo in sod., 1996), zato lahko dognanja mnogokrat povežemo z višjimi evkarionti (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Tekom celičnega dihanja kvasovk se proizvaja veliko ROS, katerih toksične efekte morajo celice nevtralizirati in popraviti. In ravno kvasovke v stacionarni fazi rasti imajo uspešne in aktivne zaščitne mehanizme, ki obvladujejo kopičenje oksidativnih in drugih poškodb (Gray in sod., 2004). Tudi Zakrajšek in sodelavci so uporabili *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti kot modelni organizem za študij okoljskih stresov. Na podlagi rezultatov, ki so jih pridobili na celični in proteomski ravni s pomočjo kulture kvasovk v stacionarni fazi rasti, so jo opredelili kot primerno za študij sprememb v oksidacijskem in metabolno-energijskem statusu. V stacionarni fazi so celice pokazale največjo stabilnost, kar se tiče znotrajcelične oksidacije. Poleg tega avtorji poudarjajo, da je pomembno, da so celice za takšne raziskave še vedno v dobri kondiciji in tako lahko uspejo vzdrževati ravnovesje med antioksidanti in oksidanti, ter s tem preprečujejo nastanek oksidativnega stresa (Zakrajšek in sod., 2011).

2.1.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres je splošno definiran kot stanje porušenega ravnovesja v organizmu med antioksidanti in oksidanti oziroma ROS (Kovacic in Jacintho; 2001; Valko in sod., 2001). To se v bioloških sistemih zgodi, ko pride do prevelike proizvodnje ROS na eni strani ter pomanjkanja encimske in neencimske antioksidativne obrambe na drugi strani (Dröge, 2002). Tako, kot pri višjih evkariontih, tudi pri kvasovkah ROS nastajajo po naravni poti, kot produkti celičnega metabolizma. Tudi kvasovke imajo obrambne celične mehanizme, ki so sposobni pod običajnimi fiziološkimi pogoji preprečevati molekularne poškodbe in

vzdrževati redoks ravnotežje. Vendar se to ravnovesje poruši, ko so kvasovke izpostavljene razli nim okoljskim stresorjem, kot na primer prisotnosti oksidantov, toplotnemu šoku, etanolu in kovinskim ionom. Takrat se proizvaja ve ja koli ina ROS, zato pride do tako imenovanega oksidativnega stresa, ki se med drugim kaže kot peroksidacija lipidov, oksidacija proteinov in poškodbe nukleinskih kislin. Do tega neravnovesja lahko pride iz ve razlogov: 1) zmanjšanje koli ine antioksidantov (zaradi ksenobiotikov ali mutacij, ki prizadenejo antioksidativno obrambo); 2) pove ane proizvodnje ROS (zaradi izpostavitve hipoksi nim pogojem ali zaradi aktivacije sistemov, ki nenehno proizvajajo ROS) (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Celica vse to zazna in sproži aktivacijo razli nih obrambnih mehanizmov, kar imenujemo odgovor na oksidativni stres. Poznamo primarno obrambo, ki samo nevtralizira ROS in sekundarno obrambo, ki bodisi popravlja poškodbe, bodisi razgrajuje oziroma odstranjuje oksidirane molekule (Moradas-Ferreira in Costa, 2000).

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z neparnim elektronom, ki so nestabilni in zelo reaktivni, ker težijo k vzpostavitvi kemijskih reakcij z ostalimi molekulami. Obi ajno nastajajo iz treh elementov; kisika, dušika in žvepla, pri emer nastajajo reaktivne kisikove, dušikove in žveplove zvrsti (Lü in sod., 2010). Že davnega leta 1954 so Gerschman in sodelavci v sklopu teorije o prostih radikalih ugotovili, da je kisik toksi en v reducirani obliki (Gerschman in sod., 1954). Dve leti kasneje je Denham Harman predstavil kompleks prostih radikalov, kot enega klju nih udeležencev v procesu staranja (Harman D., 1956). Naslednji napredek raziskovanj na podro ju prostih radikalov se je zgodil leta 1969, ko sta McCord in Fridovich odkrila encim superoksid dismutazo (SOD) (McCord in Fridovich; 1969). Reaktivne kisikove (ROS) zvrsti so skupina molekul, ki nastanejo iz molekularnega kisika, medtem ko so prosti radikali molekule ali molekularni delci z enim ali ve neparnih elektronov (Halliwell in Gutteridge, 2007). eprav molekularni kisik v svoji zunanji lupini vsebuje dva nesparjena elektrona, ni preve reaktiven, zato ker imata elektrona isti spin. e pa kateri izmed teh dveh elektronov spremeni svoj spin, nastane singletna oblika kisika, ki je zelo mo en oksidant (Herrero in sod., 2007). e se kisik reducira z enim elektronom, nastane superoksidni anionski radikal ($O_2^{\bullet-}$), ki je relativno stabilen intermediat in je tako imenovani primarni ROS, ki nadalje reagira z ostalimi molekulami, bodisi skozi encimsko ali kovinsko katalizirane reakcije in je tako prekurzor ve ine sekundarnih ROS (Valko in sod., 2005). Najpogostejše mesto nastajanja superoksidnega aniona so mitohondriji (Cadenas in Sies, 1998). Pri spontani ali s superoksid dismutazo povzro eni pretvorbi superoksidnega aniona nastane vodikov peroksid, ki se nadalje lahko s peroksidazami reducira do vode. Ob prisotnosti reduciranih kovin lahko pride do delne redukcije vodikovega peroksida in nastanejo hidroksilni radikali ($\bullet OH$) (Herrero in sod., 2007), ki imajo zelo kratko razpolovno dobo (10^{-9} sekunde) in so zelo reaktivni, kar jih naredi ene najnevarnejših radikalov (Pastor in sod., 2000). Dodatni prosti in reaktivni radikali, ki nastajajo iz kisika v živih sistemih so še peroksilni radikali ($ROO\bullet$). Najenostavnejši peroksilni radikal je $HOO\bullet$, ki je sicer protonirana oblika superoksidnega radikala in ga ponavadi imenujemo hidroperoksilni ali perhidroksilni radikal. Vendar je obi ajno v celici

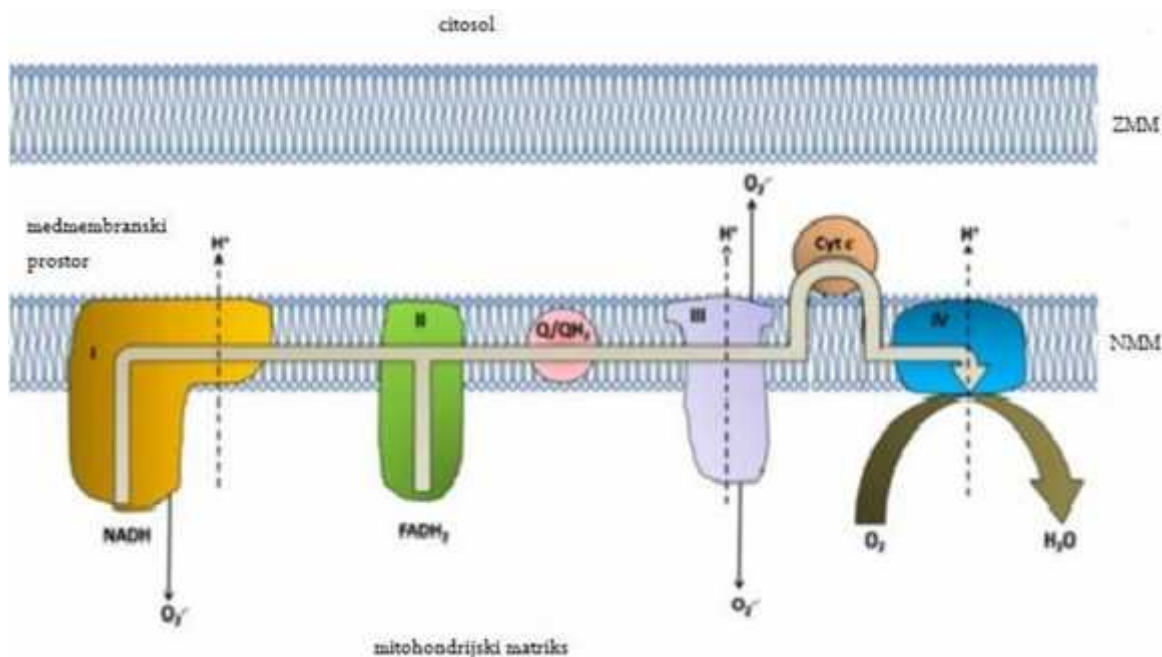
prisotnega samo 0,3 odstotka katerega koli superoksida v protonirani obliki (De Grey, 2002). Tudi peroksisomi so znani, da v fizioloških pogojih proizvajajo vodikov peroksid, vendar ne tudi superoksidnega aniona. Peroksisomi so glavna mesta porabe kisika in sodelujejo v mnogih metabolnih procesih, ki koristijo kisik. Poraba kisika v peroksisomih vodi do nastanka vodikovega peroksida, ki nato oksidira različne molekule. Peroksisom pa med drugim vsebuje tudi encim katalazo, ki razgrajuje vodikov peroksid in tako preprečuje kopičenje tega ter s tem pripomore k vzdrževanju ravnovesja ROS (Valko in sod., 2004).

Oksidativni stres lahko povzroči tudi z drugimi agenci, kot na primer s težkimi kovinami (Bhattacharyya in sod., 2012; Pal in sod., 2011; Das in sod., 2009), s protirakovinimi in drugimi zdravili (Das in sod., 2011; Pal in sod., 2012), z ultravijoličnim sevanjem, z onesnaževalci zraka, s herbicidi (Sarkar in Sil, 2010; Halliwell in Cross, 1994; Ghosh in sod., 2012) in z dodatkom ksenobiotikov, ki sprejmejo po en elektron v dihalni verigi in ga prenesejo na molekularni kisik, pri čemer spodbudijo tvorbo superoksida, brez da bi zavirali dihalno verigo (Halliwell in Gutteridge, 2007). Dve takšni snovi, ki ju pogosto uporabljamo pri študijah oksidativnega stresa pri kvasovkah sta parakvat in menadion (Cabiscol in sod., 2000).

Menadion (2-metil-1,4-naftokinon ali vitamin K₃) je policiklični aromatski keton, ki lahko služi kot prekursor v sintezi vitamina K (Brière in sod., 2004; Floreani in Carpenedo, 1992). Kot kinon lahko menadion tako preide redukcijo enega elektrona, pri čemer nastane semikinonski radikal, ki nato reducira molekularni kisik v superoksidni anionski radikal in se tako nazaj oksidira v začetno kinonsko obliko. Poleg tega so kinoni potencialni elektrofilni, sposobni reagirati s tiolnimi skupinami proteinov (Monks in Jones., 2002; Chung in sod., 1999). Delovanje menadiona so povezali z različnimi boleznimi, vključno s hemolitično anemijo (Alarcón in sod., 1991) in kardiotoxicičnostjo (Tzeng in sod., 1992). Na drugi strani pa so številni znanstveniki poročali o farmakološki pomembnosti menadiona kot kemoterapevtske učinkovine pri različnih vrstah raka (Nutter in sod., 1991). Monteiro in sodelavci so naredili sistematično študijo z namenom, da bi odkrili učinkovine menadiona na organizacijo lipidov v membrani. To so naredili z uporabo modela, ki je posnemal mitohondrijske membrane in z naravnimi mitohondrijskimi membranami. Ugotovili so, da se menadion vključuje v membranske sisteme, sestavljene iz enojnih fosfolipidov (fosfatidilholina) in tudi v mitohondrijske membrane ter s tem spremeni organizacijo lipidov in fluidnost membran. Tako so potrdili prejšnja ugibanja o mitohondrijski toksičnosti menadiona in spodbujanju apoptoze (Monteiro in sod., 2013).

2.1.3 Mitohondriji kot glavni vir ROS

Pri fizioloških pogojih je glavni znotrajcelni vir ROS puščanje elektronov iz mitohondrijske elektronske transportne verige, pri čemer ROS nastajajo na različnih mestih dihalne verige (Nohl in sod., 2003), kar je razvidno tudi na sliki 1.



Slika 1: Mesta nastanka ROS v mitohondrijski dihalni verigi (Krishnendu in sod., 2013).

ZMM predstavlja zunanjo mitohondrijsko membrano, NMM pa notranjo mitohondrijsko membrano. Mesta označena z I, II, III in IV predstavljajo komplekse mitohondrijske dihalne verige, rtkane rte pa tvorbo superoksidnega radikala (O₂^{•-}).

Tako so na primer v višjih evkariontih identificirali kot glavna mesta nastanka ROS v mitohondrijih kompleks citokrom bc1 (Turrens, 1997) in ubikinon oksidoreduktazo oziroma kompleks I (Raha in Robinson, 2000). Do največje produkcije superoksidnega radikala pride na kompleksu I v mitohondrijskem matriksu oziroma na notranji strani notranje mitohondrijske membrane (NMM) (De Vries, 1986). Proizvodnjo superoksidnega radikala s strani kompleksa I lahko spodbudi prisotnost sukcinata, substrata kompleksa II (Liu in sod., 2002). Poleg kompleksa I, je tudi kompleks III znan kot pomembno mesto nastanka velike količine superoksidnega radikala, in sicer na obeh straneh notranje mitohondrijske membrane (Grigolava in sod., 1980; Turrens in Boveris, 1980), še posebno v mitohondrijsko dihanje zavremo z antimicinom, znanim zaviralcem kompleksa III (Muller in sod., 2004). Ubikinon, komponenta mitohondrijske dihalne verige, ki povezuje kompleks I s kompleksom III in kompleks II s kompleksom III, je znan kot ključni povezovalci pri tvorbi superoksidnega radikala s strani kompleksa III (Rich in Bonner, 1978). Oksidacija ubikinona poteka v zaporedju reakcij, imenovanim Q-cikel, pri čemer nastane nestabilen intermedij semikinon, ki je nato odgovoren za tvorbo superoksidnega radikala (Turrens in sod., 1985). Zatem manganova superoksid dismutaza (Mn SOD) znotraj mitohondrijskega matriksa pretvori superoksidni anion v vodikov peroksid, ki se bodisi naprej razgradi z glutation peroksidazo in peroksiredoksinom, bodisi prehaja z difuzijo preko notranje in zunanje mitohondrijske membrane v citosol (Han in sod., 2003). Superoksidni anion sam namreč ne more prehajati preko bioloških membran, razen v protonirani obliki, kar pa

predstavlja le manjši delež celokupne koncentracije superoksida pri fiziološkem pH (Gus'kova in sod., 1984). Kljub temu se lahko del superoksida, ki nastane med mitohondrijskim dihanjem preko prenašalcev prenese v medmembranski prostor (Fariss in sod., 2005). Pri nekaterih celi nih tipih je v medmembranskem prostoru prisotna baker-cinkova superoksid dismutaza (Cu-Zn SOD), kjer pretvarja superoksidne anione v vodikov peroksid, le-ta pa lahko z difuzijo prehaja v citosol. Alternativno lahko superoksidne radikale v medmembranskem prostoru lovi citokrom *c* ali pa celo lahko prehaja z difuzijo skozi anionske kanale, ki so v zunanji mitohondrijski membrani v citosol (Madesh in Hajnoczky, 2001).

Z razliko od višjih evkariontov pa *Saccharomyces cerevisiae* nima kompleksa I, ampak ima na notranji mitohondrijski membrani nameš ene tri NADH dehidrogenaze (Bakker in sod., 2001). NADH, ki nastaja v mitohondrijskem matriksu se oksidira z notranjo NADH ubikinon oksidoreduktazo, za katero so predpostavili, da naj bi imela klju no vlogo pri regulaciji redoks ravnovesja na ravni mitohondrijskega NADH, ki nastaja v ciklu citronske kisline (Marres in sod., 1991). Z razliko od sesalskih mitohondrijev, kvasni mitohondriji tako kot rastlinski oksidirajo citosolni NADH direktno (Ohnishi, 1973). Dve zunanji NADH dehidrogenazi sta nameš eni na notranji mitohondrijski membrani tako, da imata aktivni mesti obrnjeni proti mitohondrijskemu medmembranskemu prostoru. Ker je mitohondrijska notranja membrana neprepustna za NADH, ti dve dehidrogenazi oksidirata citosolni NADH, ki se sproš a pri procesu glikolize (Overkamp in sod., 2000).

2.1.4 Poškodbe nastale kot posledica oksidativnega stresa

e so reaktivne kisikove zvrsti prisotne v visokih koncentracijah so lahko pomembni posredniki nastanka poškodb celi nih struktur, nukleinskih kislin, lipidov in proteinov (Valko in sod., 2006). Oksidativne poškodbe povzro ene z ROS so povezane s številnimi loveškimi boleznimi, kot so diabetes (Das in sod., 2012; Das in Sil, 2012; Rashid in sod., 2012) in nevrodegenerativne bolezni, kot na primer Parkinsonova bolezen (Hirsch, 1993), Alzheimerjeva bolezen (Behl, 1999) in amiotrofna lateralna skleroza (Andrus in sod., 1998). Prav tako so dokazali, da imajo ROS klju no vlogo pri napredovanju raka (Ames in sod., 1995; Farrugia in Balzan, 2012) in v procesu staranja pri ljudeh (Orr in Sohal, 1994).

2.1.4.1 Poškodbe nukleinskih kislin

Med poškodbe DNA povzro ene s prostimi radikali uvrš amo kemijske in strukturne spremembe, kot so delecije in spremembe baz, bralnih okvirjev, prelomi dvojne vija nice, navzkrižne povezave med proteini in DNA, ipd. (Dizdaroglu in sod., 2002; Valko in sod., 2004). Hidroksilni radikal je na primer znan po tem, da reagira z vsemi komponentami molekule DNA in pri tem poškoduje tako purinske kot pirimidinske baze kot tudi deoksiribozno ogrodje (Halliwell in Gutteridge, 2000). Najbolj preu evana poškodba DNA je tvorba 8-OH-G. Trajna sprememba genetskega materiala, ki nastane kot posledica te poškodbe, predstavlja za etni korak vpletenosti v mutagenozo, karcinogenozo in staranje (Valko in sod., 2007). Znano je, da s kovinami povzro ena tvorba ROS posledici no povzro i

napad, ne samo na molekule DNA, vendar tudi na druge celi ne komponente, vklju ujo polinasi ene maš obno-kislinske ostanke fosfolipidov, ki so tudi sicer izjemno ob utljivih na oksidacijo (Siems in sod., 1995).

2.1.4.2 Oksidacija proteinov

Mehanizme, ki so vpleteni v oksidacijo proteinov z ROS, so odkrili s študijami, v katerih so aminokislina, enostavne peptide in proteine izpostavili ionizirajo im sevanjem v kontroliranih pogojih, kjer so se tvorili hidroksilni ali mešanica hidroksilnih in superoksidnih radikalov. Stranske verige vseh aminokislinskih ostankov proteinov, še posebno cisteinskih in metioninskih ostankov so zelo dovzetne za oksidacijo s strani delovanja ROS (Stadtman, 2004). Oksidacija cisteinskih ostankov lahko vodi do reverzibilne tvorbe mešanih disulfidov med tiolnimi SH-skupinami proteinov in nizko-molekularnimi tioli, predvsem z glutationom. Koncentracija karbonilnih skupin, ki nastanejo z razli nimi mehanizmi, je dobro merilo za stopnjo z ROS posredovane oksidacije proteinov. Razvili so namre veliko število visoko ob utljivih metod za identifikacijo karbonilnih skupin proteinov (Dalle-Donne in sod., 2003; Dalle-Donne in sod., 2005).

2.1.4.3 Peroksidacija lipidov

Za ne se z napadom radikala na stranske verige maš obnih kislin in s tem odstranitvijo atoma vodika od metilenskega ogljika. Ve kot je prisotnih dvojnih vezi v maš obnih kislinah, tem lažje je odstraniti atome vodika in posledi no tvoriti radikal. Mononasi ene in nasi ene maš obne kisline so bolj odporne na radikale kakor polinasi ene maš obne kisline. Po odstranitvi vodikovega atoma, centralni ogljikov atom reagira s kisikom in tvori peroksilni radikal. Molekule le-tega pa so visoko reaktivne in privzemajo atome vodika bližnjih molekul in s tem sprožijo verižno reakcijo lipidne peroksidacije (Halliwell in Chirico, 1993).

2.2 ANTIOKSIDANTI

Izpostavitev prostim radikalom, je organizme prisililo, da so razvili mnogo razli nih obrambnih mehanizmov. Obrambni mehanizmi, ki delujejo proti oksidativnemu stresu, povzro enim z ROS vklju ujejo: 1) preventivne mehanizme, 2) popravljalne mehanizme, 3) fizi no obrambo in 4) antioksidativno obrambo. Halliwell in Gutteridge sta antioksidante definirala kot spojine, ki, e so prisotne v nizkih koncentracijah v primerjavi s substratom, ki je na voljo oksidacijam, potem prepre ujejo ali zavirajo oksidacijo tega substrata (Halliwell in Gutteridge, 1995). Antioksidativno delovanje se lahko kaže na razli ne na ine: 1) zaviranje tvorbe prostih lipidnih radikalov, 2) prepre itev širitve avtooksidacijskih verižnih reakcij, 3) lovljenje prostih kisikovih radikalov, 4) sinergisti no delovanje z drugimi antioksidanti, 5) zaviranje prooksidativnih encimov, itd. (Darmanyan in sod., 1998; Heim in sod., 2002; Min in Boff, 2002; Pokorný , 2007; Kancheva, 2009).

2.2.1 Endogena antioksidativna obramba

Poznamo encimsko in ne-encimsko antioksidativno obrambo. Kot je razvidno iz preglednice 1, med encimsko med drugimi vklju ujemo superoksid dismutazo (angl. *superoxide*

dismutase – SOD), glutation peroksidazo (Gpx) in katalazo (CAT). Ne-encimske antioksidante pa predstavljajo askorbinska kislina oziroma vitamin C, -tokoferol ali vitamin E, glutation (GSH), karotenoidi, flavonoidi in še mnogi drugi antioksidanti. V normalnih pogojih vlada ravnovesje med aktivnostjo in znotrajceli no koncentracijo teh antioksidantov. To ravnovesje je nujno za preživetje organizmov in njihovo zdravje (Cadenas, 1997).

Preglednica 1: Primarni endogeni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Walker, 1998; Zakrajšek, 2014).

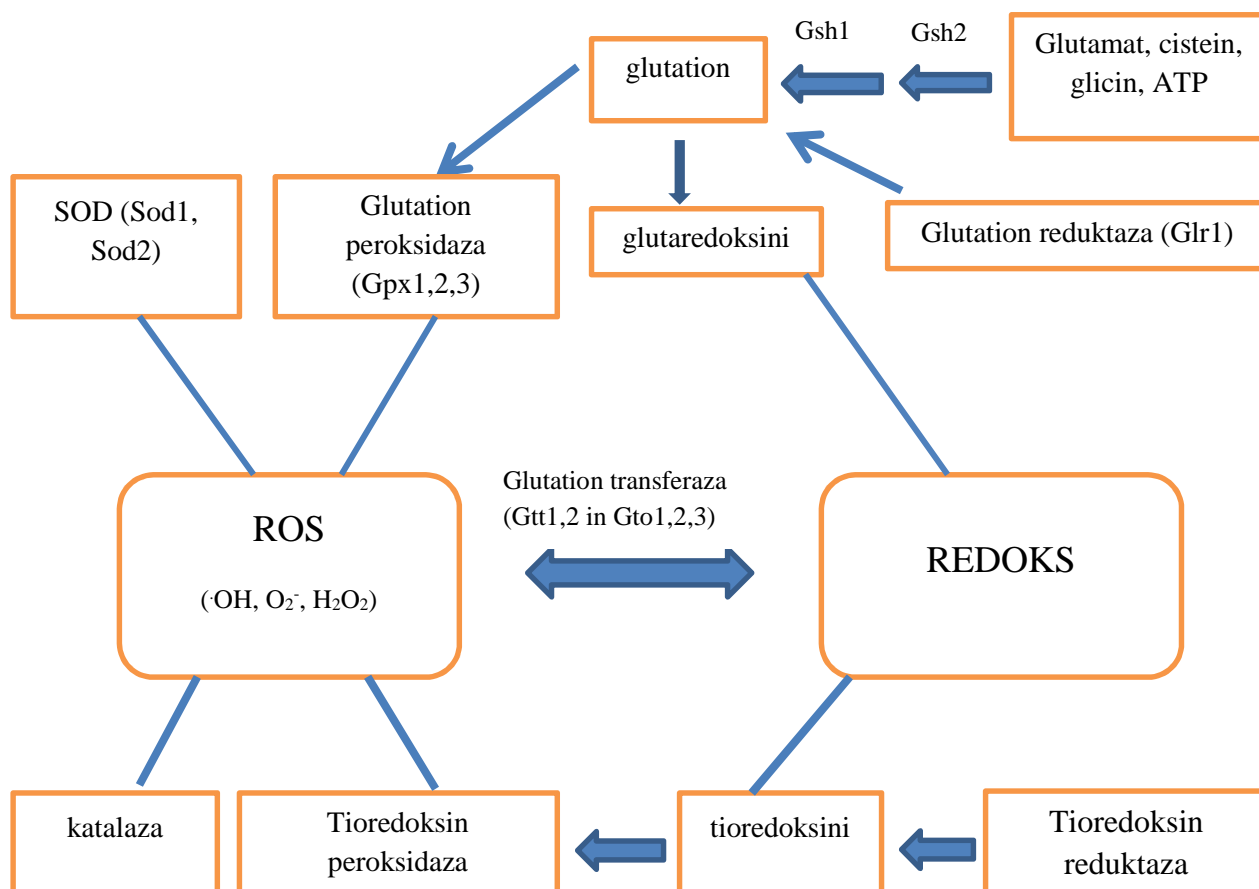
Endogeni obrambni sistemi	Funkcija
Encimski obrambni sistemi	
Mn SOD	Dismutacija superoksidnih anionov v mitohondrijih
Cu-Zn SOD	Dismutacija superoksidnih anionov v citoplazmi
katalaza T	Razgradnja vodikovega peroksida v citoplazmi
katalaza A	Razgradnja vodikovega peroksida v peroksisomih
tioredoksin peroksidaza	Razgradnja vodikovega peroksida in alkiliranih hidroperoksidov
tioredoksin reduktaza*	Redukcija oksidirane tioredoksina
glutation peroksidaza	Redukcija vodikovega peroksida in alkiliranih hidroperoksidov
glutation reduktaza*	Redukcija oksidirane glutationa
citokrom c peroksidaza	Redukcija vodikovega peroksida
glukoza-6-P-dehidrogenaza	Redukcija NADP ⁺ v NADPH
Ne-encimski obrambni sistemi	
glutation*	Lovljenje prostih radikalov, redukcija disulfidnih mosti kov v proteinih
glutaredoksin*	Redukcija disulfidnih mosti kov v proteinih
tioredoksin*	Redukcija disulfidnih mosti kov v proteinih
metalotionini	Vezava bakrovih ionov, lovljenje superoksidnih in hidroksilnih radikalov
poliamini	Zaš ita lipidov pred oksidacijo

* Obrambne sisteme lahko uvrš amo tudi v sekundarne antioksidativne obrambne sisteme, ker so zmožni popravila oksidativnih poškodb proteinov.

2.2.1.1 Encimska obramba

Encimsko antioksidativno obrambo delimo na primarno in sekundarno. Primarna obramba prepre uje nastanek prostih radikalov ali pa jih nevtralizira. Sem sodijo: 1) glutation

peroksidaza, ki daruje dva elektrona za redukcijo peroksidov, pri čemer se tvorijo selenoli in tudi odstranjuje perokside, kot potencialne substrate za Fentonovo reakcijo; 2) katalaza, ki pretvarja vodikov peroksid v vodo in molekularni kisik in 3) superoksid dismutaza, ki pretvori superoksidne anione v vodikov peroksid, ki je substrat za katalazo (Rahman, 2007) ter še ostali encimi. Sekundarna encimska obramba pa vključuje glutation reduktazo in glukoza-6-fosfat dehidrogenazo. Naloga prve je, da reducira antioksidant glutation iz oksidirane v reducirano obliko in ga s tem reciklira ter tako omogoči nadaljnjo nevtralizacijo prostih radikalov. Druga pa regenerira nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (angl. *nicotineamide adenine dinucleotide phosphate – NADPH*) (Gable in Burke, 1984; Ratnam, 2006). Ta dva encima ne nevtralizirata prostih radikalov neposredno, vendar imata podporno vlogo pri delovanju drugih endogenih antioksidantov (Carrocho in Ferreira, 2013). Shematski prikaz celotne encimske antioksidativne obrambe pri *Saccharomyces cerevisiae* je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Prikaz encimske antioksidativne obrambe *Saccharomyces cerevisiae* (Herrero in sod., 2007). To so encimi, ki so vključeni v razstrupljanje ROS in v nadzor redoks stanja proteinskih sulfhidrilnih skupin ter povezave med njimi. Glutation transferaze predstavljajo most med dvema obrambnima mehanizmoma.

Od zgoraj omenjenih encimskih antioksidativnih sistemov bo podrobneje predstavljena SOD, ki je tudi predmet naloge. Poleg le-te pa sta pri *Saccharomyces cerevisiae* pomembni še katalaza in peroksidaza. *Saccharomyces cerevisiae* ima dve katalazi, Cta1, ki se nahaja v peroksisomih in Ctt1, ki je citosolna. Katalaze reducirajo vodikov peroksid z izkoriščanjem redoks lastnosti hemo skupine, ki je pripeta na polipeptid (Hiltunen in sod., 2003). Antioksidativna vloga proti ROS s strani SOD in katalaze je odvisna od redoks lastnosti kovinske skupine, ki je vezana na encim. To pa ne velja za peroksidaze, ki reducirajo anorganske in organske peroksidge v pripadajoče alkohole z uporabo aktivnega mesta tiolne skupine cisteina. Peroksidaze za svojo aktivnost potrebujejo donorje elektronov za svoje tiolne skupine in glede na to poznamo dva razreda peroksidaz: glutation peroksidaze (GPX), ki uporabljajo glutation (GSH) in tioredoksin oz. peroksiredoksin peroksidaze, ki uporabljajo tioredoksin kot reducent (Brihelius-Flohe, 2006).

Superoksid dismutaza deluje antioksidativno tako, da katalizira pretvorbo superoksidnega aniona v vodikov peroksid in za svojo aktivnost zahteva prisotnost kovinskih ionov, kot so

baker, cink in mangan (Fridovich, 1995; Culotta in sod., 2006). Evkarionti, med njimi tudi *Saccharomyces cerevisiae* imajo dva encima SOD: Cu-Zn SOD, ki je kodirana z genom *sod1* in se nahaja v citosolu ter predstavlja devetdeset odstotkov celotne SOD aktivnosti ter Mn SOD, ki jo kodira gen *sod2* in se nahaja v mitohondrijskem matriksu (Culotta in sod., 2006). Kljub temu, naj bi se del Cu-Zn SOD nahajal tudi v medmembranskem prostoru mitohondrija (Sturtz in sod., 2001). Obe sta kodirani z jedrnim genomom in se sintetizirata v citoplazmi. Mn SOD se sintetizira kot prekurzor z visoko molsko maso, ki se nato prenaša v mitohondrije in se tam nadalje procesira do zrele oblike (Autor, 1982). Tako Sod1 kot Sod2 naj bi imeli vlogo pri razstrupljanju superoksidnega aniona, ki se tvori v mitohondrijski dihalni verigi, del pa lahko difundira v medmembranski prostor (Han in sod., 2001). Fenotipi ni tih mutant genov *sod1* in *sod2* omogoajo preu Evanje in ugotavljanje funkcij in pomembnosti teh dveh encimov. Tako so ugotovili, da je Mn SOD esencialna za obrambo proti superoksidnemu anionu, ki nastaja v mitohondrijski dihalni verigi, saj je ni ta mutanta gena *SOD2* preob utljiva na hiperoksi ne pogoje in ni sposobna rasti v aerobnih pogojih (van Loon in sod., 1986; Guidot in sod., 1993; Costa in sod., 1997). Kljub temu pa znanstveniki predvidevajo, da Mn SOD nima pomembne vloge v obrambi proti eksogenim oksidantom. Na drugi strani pa mutante gena *sod1* kažejo različne fenotipe, kot so slaba rast v aerobnih pogojih, izguba viabilnosti v stacionarni fazi rasti *Saccharomyces cerevisiae* in preob utljivost na zunanje dodane oksidante, kot sta parakvat in menadion (Gralla in Valentine, 1991; Liu in sod., 1992; Longo in sod., 1996).

Vse poznane molekule SOD za svoje delovanje potrebujejo kovinski ion v svojem aktivnem mestu. Kovinski kofaktorji katalizirajo tako eno-elektronsko oksidacijo superoksidnega aniona v prvem koraku reakcije, kot tudi redukcijo drugega superoksidnega aniona v drugem koraku, pri čemer se v celotni reakciji sprostita kisik in vodikov peroksid. Te reakcije običajno ne potrebujejo zunanjih virov redoks moči. To omogoča SOD, da deluje v različnih znotrajceli in zunajceli okoljih (Kurtz, 2004).

Cu-Zn SOD je razmeroma robusten encim, saj je odporen na fizikalno in kemijsko denaturacijo. Aktiven je tudi v prisotnosti mnogih denaturantov, kot sta 10 M urea in 4% SDS (Hottinger in sod., 1997). Zaporedje in struktura encima sta visoko ohranjena, tako med prokarionti kot evkarionti (Bordo in sod., 1994). Protein se zvije v obliko dimera in vsaka enota ima imunoglobulinom podobno obliko, ki zagotavlja aktivno mesto z enim bakrovim in enim cinkovim ionom (Khare in sod., 2004). Za aktivnost Cu-Zn SOD je esencialna disulfidna medmolekulska vez. Šaperon Ccs1 sodeluje pri dostavi in vključitvi bakra v apoprotein Sod1, sodeluje pa tudi pri tvorbi disulfidne vezi in zorenju proteina. Na drugi strani pa vezava cinkovega iona ni esencialna za potek pretvorbe superoksidnega aniona, vendar zagotavlja višjo temperaturno stabilnost (Khare in sod., 2004).

Družina Mn oz. Fe SOD je sestavljena iz dimernih ali tetramernih podenot velikih okoli 21 kDa, s sekvenčno homologijo in ohranjenimi proteinskimi oblikami. Znotraj vsake podenote je v aktivnem mestu vezan manganov ali železov atom, ki služi kataliziranju

pretvorbe superoksidnega aniona v kisik in vodikov peroksid. Dimerne oblike so prisotne predvsem pri bakterijah in ostalih prokariotih, medtem ko imajo evkarionti prisotno samo Mn SOD v tetramerni obliki, Fe SOD pa je običajno odsotna (Wintjens in sod., 2004). V vseh primerih je Sod 2 polipeptid kodiran z jedrnim genom in se prenese v mitohondrijski matriks. Sintetizira se kot prekursorski polipeptid, ki na N-terminalnem koncu vsebuje predzapis za mitohondrije, da lahko kasneje preide v mitohondrije. Manganov atom je esencialen za aktivnost in se vstavi samo v na novo sintetiziran protein Sod2, ki se sproti prenese v mitohondrije. Ribosomi za prevajanje zapisa za Sod2 se nahajajo na zunanji mitohondrijski membrani, kar omogoča tesno sklopitev prevajanja zapisa v protein in mitohondrijskega prenosa (Luk in sod., 2005). Za dostavo in vgradnjo mangana v Sod2 pa sta odgovorna dva membranska transporterja; Smf2 in Mtm1 manganov transporter, sicer oba sama mitohondrijske družine prenašalcev (Culotta in sod., 2006).

2.2.1.2 Neencimska obramba

Med neencimske endogene antioksidante uvrščamo veliko spojin, med drugim vitamin A, kofaktorje encimov (npr. koencim Q 10), dušikove spojine (se na kislina) in peptide, med katerimi je najpomembnejši glutation.

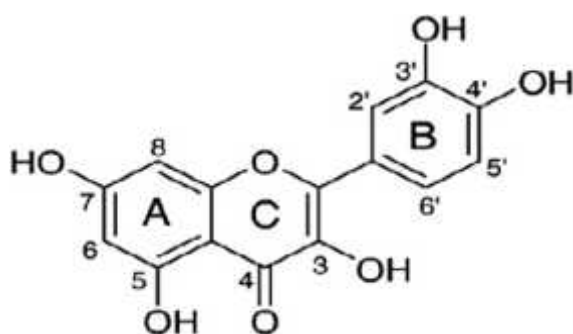
Glutation je tripeptid, kljub ni tiolni antioksidant in redoks pufer celice (Masella in sod., 2005). Oksidirana oblika glutaciona je glutation disulfid. Glutation je visoko zastopan v citosolu (1-11 mM), jedru (3-15 mM) ter v mitohondrijih (5-11 mM) in je kljub ni topni antioksidant v omenjenih delih celice. Sintetizira se v citosolu z zaporednim delovanjem glutamat-cistein ligaze in glutation sintetaze, s transportom preko notranje mitohondrijske membrane pa se prenese tudi v mitohondrije, in sicer po sistemu elektronevtralnega antiporta, za kar sta zadolžena dva mitohondrijska prenašalna proteina: dikarboksilat nosilni protein in oksoglutarat nosilni protein. Pred časom so znanstveniki dokazali, da naj bi se zunanje dodan glutation prenašal v mitohondrije, kljub temu, da ga je v mitohondrijskem matriksu prisotnega že okoli 8 mM (Shen in sod., 2005). V jedru glutation vzdržuje redoks stanje kritičnih proteinskih sulfhidrilov, ki je nujno za izražanje in popravilo molekule DNA. Oksidirani glutation se kopiči znotraj celic in razmerje med glutationom ter glutation disulfidom je dobro merilo oksidativnega stresa pri organizmih (Nogueira in sod., 2004; Jones in sod., 2000). Glutation ima proti oksidativnemu stresu več različnih vlog: 1) je kofaktor različnih razstrupljajočih encimov, ki delujejo proti oksidativnemu stresu, kot sta na primer glutation peroksidaza in glutation transferaza; 2) sodeluje pri prenosu aminokislin skozi plazemsko membrano; 3) direktno lovi vodikove in superoksidne radikale, tako da eliminira vodikov peroksid in lipidne peroksidge s pomočjo katalitičnega delovanja glutation peroksidaze; 4) sposoben je regeneracije večine pomembnih antioksidantov v njihove aktivne oblike, kot sta vitamin C in E (Masella in sod., 2005).

2.2.2 Eksogena antioksidativna obramba

Kljub dokazani učinkovitosti endogeni antioksidativni sistem pogosto ne zadostuje, zato so organizmi odvisni od različnih tipov antioksidantov, ki so prisotni v hrani (kvercetin, vitamin

C, karotenoidi, itd.), da lahko uspešno vzdržujejo proste radikale v nizkih koncentracijah (Pietta, 2000). V naši nalogi smo uporabili vitamin C in kvercetin, zato ju bomo tudi podrobneje opisali.

Kvercetin je eden izmed najpomembnejših predstavnikov flavonoidov. Flavonoidi pa so skupina antioksidativnih spojin, sestavljeni iz flavonolov, flavanolov, antocianinov, izoflavonoidov, flavanonov in flavonov. Vse te podskupine spojin imajo skupen difenilpropanski skelet. Kot je razvidno na sliki 4 imajo kvercetin in ostali flavonoidi dva benzenova obroa (A in B), ki sta povezana s kisik vsebujo im pirenskim obročem (C). Ti trije obroji so planarni in molekula je relativno polarizirana saj ima tri medmolekulske vodikove vezi (Mendoza-Wilson and Glossman-Mitnik, 2004).



Slika 3: Molekularna struktura kvercetina (Chen in sod., 2010).

Flavonoidi imajo antioksidativne lastnosti zaradi fenolnih hidroksilnih skupin, vezanih na obroja in lahko delujejo kot reducenti, donorji vodika, lovilci kisikovih in superoksidnih radikalov ter celo kot kelatorji kovin. Prav tako lahko aktivirajo antioksidativne encime, reducirajo tokoferilne radikale, zavirajo oksidaze ter povečujejo raven sečne kisline (Rice-Evans in sod., 1996; Procházková in sod., 2011).

Kvercetin (3,3',4',5',7-pentahidroksiflavon) je tipični flavonol, prisoten v večini sadja ter zelenjave, kot so čebula, aj, jabolka in jagodičevje. Ima antioksidativne in protivnetne učinke ter naj bi bil potencialna protirakavina pri inkovini (Erlund, 2004). V svoji kemijski strukturi ima aromatični del, ki ima afiniteto do lipidnega, hidrofobnega okolja, istočasno pa ima prisotnih tudi pet hidroksilnih skupin, ki so polarno usmerjene. Ima torej amfifilni značaj, zato predvidevajo, da se v membrani nahaja na meji med polarnim in nepolarnim okoljem. Lokaliziran je blizu površja membrane (Wójtowicz in sod., 1996) in tako ščiti liposomalne fosfolipide pred peroksidacijo s kisikovimi radikali (Ioku in sod., 1995). Njegova vključitev v membrano je odvisna od pH, najgloblje se vključuje v kislem okolju (Movileanu in sod., 2000). Zaradi hidrofilnega značaja sladkornih skupin, so predvidevali, da naj bi kvercetin brez teh, kot aglikon prehajal skozi gastro-intestinalni trakt s pasivno difuzijo (Kuhnau, 1976). Kasnejše študije pa so pokazale, da je absorpcija kvercetina bistveno olajšana z njegovo konjugacijo s sladkornimi skupinami (Hollman in sod., 1997; Erlund in sod., 2000). Kvercetin je odličen *in vitro* antioksidant in je najmočnejši lovilec

ROS znotraj flavonoidne družine, vključujejo $O_2^{\cdot -}$ (Hanasaki in sod., 1994; Cushnie in Lamb, 2005) ter tudi reaktivne dušikove zvrsti (angl. *reactive nitrogen species* – *RNS*), kot je dušikov oksid (NO) (Van Acker in sod., 1995; Haenen in Bast, 1999). Med antioksidativnim delovanjem se kvercetin oksidira v različne oksidacijske produkte. Pri oksidaciji dveh elektronov kvercetina nastane kvercetin-kinon (QQ), ki ima 4 tautomerne oblike (Jorgensen in sod., 1998; Awad in sod., 2002; Boots in sod., 2003b). Vsi ti oksidacijski produkti, kot so semikinonski radikali in kinoni imajo različne toksične učinke, ker lahko reagirajo s proteinskimi tioli (Kalyanaraman in sod., 1987; Ito in sod., 1988; Monks in sod., 1992; Metodiewa in sod., 1999). Pri oksidaciji dveh elektronov flavonoida kvercetina nastane oksidacijski produkt imenovan QQ, ki ima 4 tautomerne oblike, en ortokinon in tri kinonmetide (Awad in sod., 2000; Jorgensen in sod., 1998; Penning in sod., 1999). QQ je zelo reaktiven in reagira s tiolnimi skupinami in je zato toksičen (Orrenius, 1985). Glutation (GSH) je primarna tarča QQ v celicah, saj hitro reagira s QQ, pri čemer nastaneta dva glutationil-kvercetin adukta (GSQ): 6-glutationil-kvercetin (6-GSQ) in 8-glutationil-kvercetin (8-GSQ). Če je GSH prisoten, potem QQ takoj reagira z njim. Ta reakcija eliminira tako flavonoid, kakor tudi GSH iz antioksidativne mreže. Če je GSH odsoten, potem so tarča za QQ tiolne skupine proteinov, pri čemer lahko prizadane delovanje številnih encimov. Zato je pomembno, da se v celici vzdržuje primerna raven GSH, ki zaščiti proteine pred poškodbami, če se uporablja kvercetin kot antioksidant (Boots in sod., 2003).

Vitamin C ali askorbinska kislina (angl. *ascorbic acid* – *AA*) vključuje dve spojini z antioksidativno aktivnostjo: L-askorbinsko kislino in L-dehidroaskorbinsko kislino, ki se obe absorbirata skozi prebavni trakt. AA je učinkovita v lovljenju superoksidnih radikalnih anionov, vodikovega peroksida, hidroksilnih radikalov, kisika z enim elektronom in reaktivnih kisikovih oksidov (Barros in sod., 2011). Vitamin C je prisoten skoraj v vsej hrani rastlinskega izvora. Za ljudi je esencialen mikronutrient z mnogimi biološkimi funkcijami. Je močan antioksidant, ki deluje direktno preko lovljenja reaktivnih kisikovih zvrsti, kot tudi indirektno skozi regeneracijo drugih antioksidativnih sistemov. Pod določeni pogoji, kot so nizka koncentracija in prisotnost kovinskih ionov, lahko deluje celo kot prooksidant in povzroča oksidativne poškodbe lipidov, DNA in proteinov (Griffiths in Lunec, 2001). Je vodotopen reducent, ketolakton z dvema ionizirajočima hidroksilnima skupinama in donorski antioksidant, ki lahko preide dve eno-elektronski oksidaciji, pri čemer nastaneta radikal askorbata in dehidroaskorbinska kislina (DHA). Askorbat se lahko ponovno regenerira iz radikala askorbata in DHA, bodisi encimsko ali ne-encimsko. Zanj je tudi značilno, da lahko preide pH-odvisno avtooksidacijo, pri čemer nastane vodikov peroksid (Calcutt, 1951). Z lahkoto oksidira molekule, raven oksidacije pa je odvisna od pH in od prisotnosti kovinskih ionov, ki katalizirajo to reakcijo (Buettner in Jurkiewicz; 1996). Značilna koncentracija askorbata v plazmi zdravih ljudi je okoli 40-40-80 μM . Pri teh koncentracijah, lahko deluje kot endogeni antioksidant, npr. služi kot ko-antioksidant z vitaminom E pri zaščiti LDL pred oksidativnimi poškodbami, povzročeni z peroksilnimi radikali (Frei in sod., 1989). Askorbat z lahkoto odda en elektron potencialno škodljivim

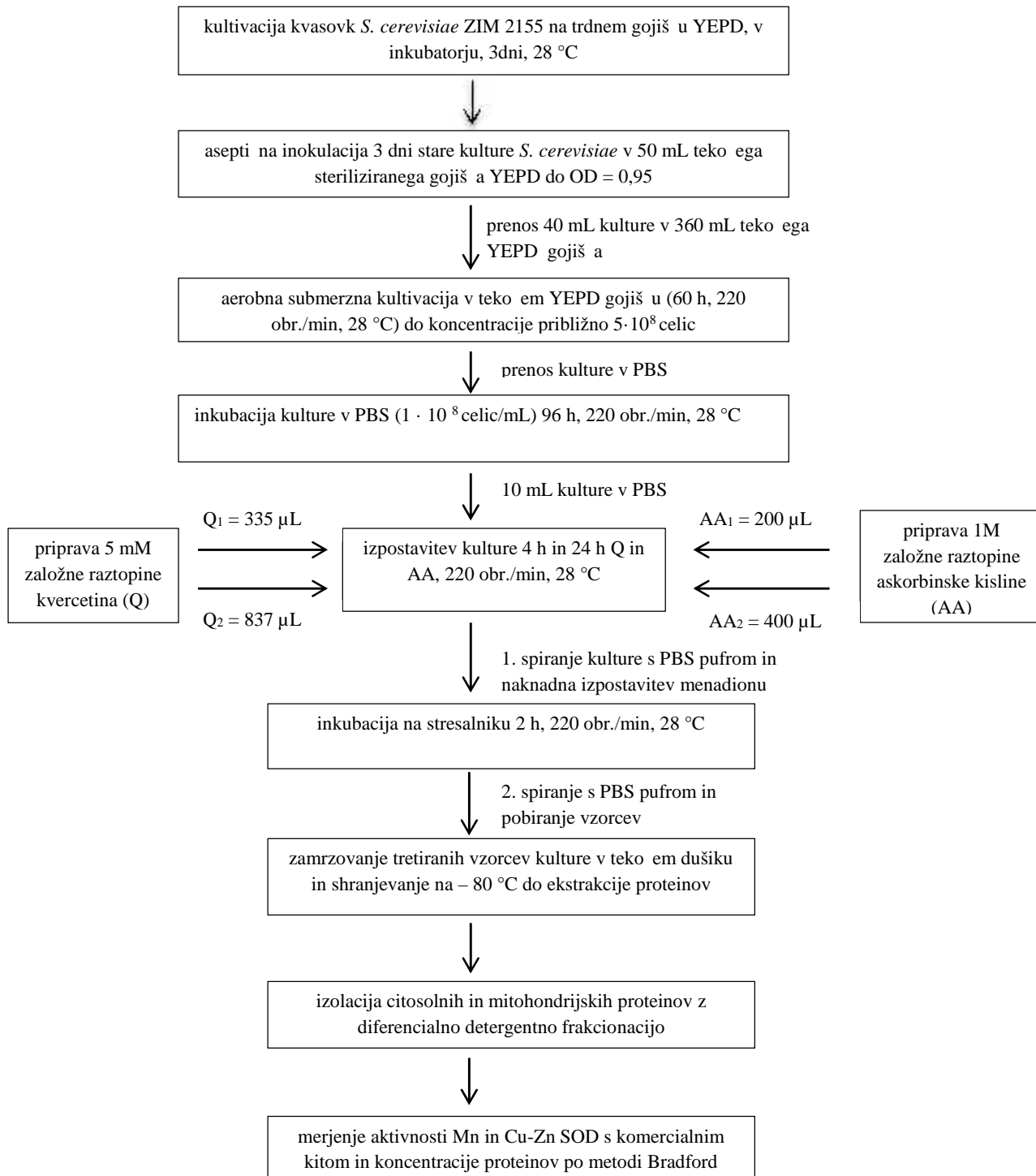
oksidirajo im radikalom, kot so hidroksilni, alkoksilni, peroksilni in tiolni radikal ter se s tem spremeni v radikal askorbata, ki je relativno nereaktiven in se lahko reducira ponovno nazaj v askorbat z NADH in NADPH reduktazami (Linster in Schaftingen., 2007).

Vitamin C ima veliko pomembnih vlog. Veliko encimov, ki ga uporabljajo kot kofaktor, se nahaja v endoplazmatskem retikulumu (Suberlich, 1994). Prav tako ima pomembno vlogo pri absorpciji železa zaradi njegove sposobnosti sodelovanja v redukcijskih reakcijah. Pomembnost vitamina C kot hidrofilnega antioksidanta je naraščala postopoma skozi desetletja z raziskovanjem kemije reaktivnih kisikovih zvrsti. Danes vemo, da regulira znotrajceli no redoks stanje z vzdrževanjem sulfhidrilnih spojin, vključno glutation in njegovega reduciranega stanja (Griffiths in Lunec, 2001). Po topnosti ga uvrščamo med vodotopne oziroma hidrofilne vitamine, zato so za njegovo znotrajceli no prenašanje potrebni prenašalci. Biodostopnost vitamina C, ki se nahaja v hrani, je odvisna od absorpcije v revesju, ki poteka z energijsko vodenim Na^+ -odvisnim procesom prenosa (Rose, 1988; Tsukaguchi in sod., 1999). Ugotovili so, da ima vitamin C tudi prooksidativno delovanje v prisotnosti kovinskih ionov, kjer deluje kot reducent, da zagotovi katalizatorje za Fentonovo reakcijo. Je odli eno-elektronski reducent, ki lahko reducira železov Fe^{3+} ion do železovega Fe^{2+} iona, pri čemer se oksidira do radikala askorbata. Fe^{2+} lahko reagira s kisikom ter ga reducira do superoksidnega radikala, ki se lahko naprej s SOD pretvori v vodikov peroksid in kisik (Du in sod., 2012). Nizka koncentracija AA poveča aktivnost kisikovih radikalov, medtem, ko v primeru visokih koncentracij pride do lovljenja hidroksilnih radikalov, superoksidnih radikalov in lipidnih peroksidov (Sakagami in sod., 2000). Koncentracija AA, ki *in vitro* deluje zaščitno, ni nujno, da bo tudi *in vivo* delovala primerljivo. Fiziološki obstoj in verjetnost, da ima vitamin C prooksidativno naravo je še v poteku raziskovanj, vendar obstoječe analize in raziskave nakazujejo na povečano stopnjo DNA oksidacijskih produktov v primeru tretiranja z vitaminom C. Ta dognanja podpirajo hipotezo, da lahko vitamin C deluje kot prooksidant *in vivo* (Podmore in sod., 1998; Rehman in sod., 1998). Na drugi strani, pa so Ivanova in sodelavci s simulacijo oksidativnega procesa in z merjenjem kemoluminiscence AA v Fentonovi raztopini pri koncentracijah AA razpona 10^{-7} do 1 mol/L, ugotovili, da je AA v osnovi le antioksidant. Samo njeni produkti oksidacije v prisotnosti kisika kažejo prooksidativne lastnosti. Prooksidativne lastnosti torej ne izhajajo neposredno iz AA, temveč iz produktov oksidacije dehidroaskorbinske kisline s kisikom, med katerimi je tudi oksalna kislina. Rezultati so pokazali, da se pri velikih koncentracijah (0,1 do 1 mol/L) AA obnaša kot antioksidant, pri koncentracijah manj kot 10^{-5} mol/L, pa je premalo nastalih produktov oksidacije, da bi se pokazal prooksidativni učinek. Le pri srednjih koncentracijah AA (10^{-3} do 10^{-4}) nastajajo produkti oksidacije v dovolj velikih količinah, da se pokaže prooksidativni učinek (Ivanova in sod., 2013).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK PRAKTI NEGA DELA

Na sliki 4 je prikaz celotnega poteka eksperimentalnega dela



Slika 4: Shema poteka prakti nega dela magistrske naloge.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Delovni mikroorganizem

Naš delovni mikroorganizem je bila kultura kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155, ki smo jo pridobili iz zbirke industrijskih mikroorganizmov Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. Kulturo smo gojili in s precepljanjem vzdrževali na trdnem YEPD gojišču na petrijevih ploščah 3 dni, $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Priprava trdnega YEPD gojišča in precepljanje kulture

- Kemikalije
 - pepton (Biolife) (20 g/ L gojišča)
 - kvasni ekstrakt (Biolife) (10 g/L gojišča)
 - glukoza (Merck) (20 g/L gojišča)
 - agar (Biolife) (20 g/L gojišča)
 - destilirana voda (dH_2O)
- Oprema, pripomočki in aparature
 - tehtnica (RadWag)
 - žlička
 - magnetno mešalo MM 540 (Tehtnica)
 - 2-L steklena aša
 - steklena steklenica z zamaškom
 - avtoklav (Sutjeska)
 - petrijeve plošče
 - brezprašna komora LFV 122 (Pio)
 - sterilne plastične eze
 - gorilnik
 - inkubator IG 150 (Jouan)

3.2.3 Priprava tekočega YEPD gojišča in inokulacija kulture

- Kemikalije
 - pepton (Biolife) (20g/L gojišča)
 - kvasni ekstrakt (Biolife) (10g/L gojišča)
 - glukoza (Merck) (20g/L gojišča)
 - destilirana voda (dH_2O)
- Oprema, pripomočki in aparature
 - tehtnica (RadWag)
 - žlička
 - magnetno mešalo MM 540 (Tehtnica)
 - 2-L steklena aša
 - 1000-mL stekleni merilni valj
 - 2 x 1-L erlenmajerica SCHOTT DURAN, 1 utor, 1 stranska roka
 - 2 x 100-mL erlenmajerica BOROSILICAT, 1 utor, 1 stranska roka

- 1 x 500-mL stekleni merilni valj
- 1 x 50-mL stekleni merilni valj
- penasti zamaški
- aluminijasta folija
- avtoklav (Sutjeska)
- brezprašna komora LFV 122 (Pio)
- sterilne plasti ne eze
- gorilnik
- spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- stresalnik Multititron (Infors HT)

3.2.4 Priprava PBS pufra (ang. *Phosphate Buffer Saline*) in prenos kulture

- Kemikalije
 - tabletko PBS (Oxoid)
 - bidestilirana voda (ddH₂O)
- Oprema, pripomočki in aparature
 - 1-L steklena aša
 - magnetno mešalo MM 540 (Tehtnica)
 - 1-L steklena merilna bučka z zamaškom
 - 1-L stekleni merilni valj
 - 1-L steklenica z zamaškom
 - 500-mL erlenmajerice SIMEX (toliko, kolikor pripravljate 200 ml kultur)
 - 100-mL stekleni merilni valji (toliko, kolikor imate 500-mL erlenmajeric)
 - penasti zamaški
 - aluminijasta folija
 - avtoklav (Sutjeska)
 - inkubator IG 150 (Jouan)
 - spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
 - 50-ml plastične falkonke s stojcem dnom
 - vrtinik TTS (Ika)
 - centrifuga 5415 B (Iskra)
 - stresalnik multititron (Infors HT)

3.2.5 Priprava založnih raztopin kvercetina, askorbinske kisline in menadiona

- 5 mM založna raztopina kvercetina
 - Kemikalije
 - kvercetin (Sigma-Aldrich)
 - 80 % etanol
 - bidestilirana voda (ddH₂O)
 - Oprema, pripomočki in aparature
 - tehtnica (RadWag)

- vrtin nik TTS (Ika)
- plasti na falkonka s stoje im dnom
- aluminijasta folija
- 2-mL Eppendorf centrifugirke

- 1 M založna raztopina askorbinske kisline
 - Kemikalije
 - askorbinska kislina (Merck)
 - filtrirana bidestilirana voda (ddH₂O)

 - Oprema, pripomo ki in aparature
 - tehtnica (RadWag)
 - 15-mL falkonka z ravnim dnom
 - žli ka
 - vrtin nik TTS (Ika)

- 1 M založna raztopina menadiona (menadion natrijev bisulfit)
 - Kemikalije
 - menadion natrijev bisulfid (Sigma-Aldrich)
 - filtrirana bidestilirana voda (ddH₂O)

 - Oprema, pripomo ki in aparature
 - tehtnica (RadWag)
 - 15-mL falkonka z ravnim dnom
 - aluminijasta folija
 - žli ka
 - vrtin nik TTS (Ika)

3.2.6 Izpostavitev kulture *Saccharomyces cerevisiae* askorbinski kislini, kvercetinu in naknadna izpostavitev menadionu

- Kemikalije
 - založne raztopine askorbinske kisline, kvercetina in menadiona
 - 96-urna stresana kultura v PBS-u

- Oprema, pripomo ki in aparature
 - 50-mL falkonke s koni nim dnom
 - pipete in plasti ni nastavki
 - penasti zamaški
 - brezprašna komora LFV 122 (Pio)

- vrtin nik TTS (Ika)
- stresalnik Multititron (Infors HT)

3.2.7 Pobiranje tretiranih vzorcev in zamrzovanje kulture v teko em dušiku

- Kemikalije
 - tabletko PBS (Oxoid)
 - bidestilirana voda (ddH₂O)
 - teko i dušik
- Oprema, pripomo ki in aparature
 - pipete in plasti ni nastavki
 - vrtin nik TTS (Ika)
 - centrifuga 5415 B (Iskra)
 - zamrzovalna skrinja -80 °C (Heraus)

3.2.8 Izolacija citosolnih in mitohondrijskih proteinov

- Kemikalije

Za izolacijo proteinov smo uporabili komercialni komplet »Cytosol Mitochondria Fractionation Kit« (CalBiochem), katerega sestava je slede a:

 - 1 x mitohondrijski ekstrakcijski pufer - MP
 - 5x citosolni ekstrakcijski pufer - CP
 - 500x raztopina inhibitorja proteaz - IP
 - 1 M raztopina ditionitrola (DTT)
- Oprema, pripomo ki in aparature
 - pipete in plasti ni nastavki
 - 12,5-mL plasti ne falkonke z ovalnim dnom (TPP)
 - 0,5 mm cirkonij-kremen eve kroglice (BioSpec Products)
 - 1,5-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
 - vrtin nik TTS (Ika)
 - centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)

3.2.9 Merjenje koncentracije proteinov v citosolni in mitohondrijski frakciji (metoda po Bradfordu)

- Kemikalije
 - Bradfordov reagent (Biorad)
- Oprema, pripomo ki in aparature
 - 1,5-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
 - pipete in plasti ni nastavki
 - 96-mestna prozorna plasti na mikrotitrsko ploš a za merjenje absorbance (Nunc)
 - vrtin nik TTS (Ika)
 - italec mikrotitrskih ploš Safire 2 (Tecan)

3.2.10 Merjenje aktivnosti citosolne (Cu-Zn) in mitohondrijske (Mn) superoksid dismutaze (SOD)

- Kemikalije
 - Za merjenje aktivnosti SOD smo uporabili komercialni komplet »Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (BioVision), ki je vseboval:
 - založno raztopino substrata WST-1 ((2-4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolij, mononatrijeva sol)
 - založno raztopino encima ksantin oksidaze
 - razred itveni SOD pufer
 - testni SOD pufer
- Oprema, pripomočki in aparature
 - pipete in plastični nastavki
 - 96-mestna prozorna plastična mikrotitrna plošča za merjenje absorbance (Nunc)
 - vrtinik TTS (Ika)
 - termomikser comfort (Eppendorf)
 - italec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)

3.3 METODE

3.3.1 Priprava trdnega YEPD gojišča in precepljanje delovne kulture

Za pripravo trdnega YEPD gojišča smo najprej stehali vse sestavine in jih nato raztopili v destilirani vodi. Gojišče smo prelili v iste steklenice z zamažkom, ki ga nismo močno zatesnili in smo nato avtoklavirali 20 min, na 121 °C pri tlaku 1,2 bara. Še precej vroče gojišče smo nalili v petrijeve plošče, po alkalizacijo, da se je strdilo in ga do uporabe hranili v temnem prostoru, na sobni temperaturi.

Delovno kulturo *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 smo precepljali vsak teden, na isti dan, približno ob istem času. Kulturo smo nato hranili v inkubatorju pri 28 °C.

3.3.2 Priprava tekočega YEPD gojišča, steklovine in inokulacija

Tekele YEPD gojišče smo pripravili podobno kot trdnega, le da nismo dodali agarja za strjevanje. Raztopljenega smo z merilnim valjem odmerili po 50-mL v dve 100-mL erlenmajerici in po 360-mL v dve 1000-mL erlenmajerici s stransko roko. Ena erlenmajerica je kasneje pri inokulaciji služila kot slepi vzorec, v drugo pa smo inokulirali kulturo. Tako pripravljene smo skupaj z gojiščem avtoklavirali 20 min, na 121 °C, pri tlaku 1,2 bar in ohladili na sobni temperaturi.

Inokulacijo smo delali aseptično, pri čemer smo najprej postopoma s cepilno zanko prenesli tri dni staro kulturo s plošče do optične gostote pri 650 nm 0,94 – 0,96 v 50-mL gojišču in v 100-mL erlenmajerici z enim utorom in 1 stransko roko. Nato smo v 50-mL merilnem valju odmerili 40-mL inokuliranega gojišča v 1000-mL erlenmajerico (1 utor, 1 stranska roka) s

360-mL gojiš a. Sledila je 60-urna kultivacija kvasovk na stresalniku pri 220 obr./min in 28 °C.

3.3.3 Priprava PBS pufra in prenos kulture

PBS puffer smo pripravili tako, da smo v bidestilirani vodi raztopili 1 tabletko PBS v 100 mL ddH₂O. Raztopljen PBS smo umerili v merilni buki in nato prelili v steklenico z zamaškom, ki ga nismo povsem zatesnili. Tako smo ga avtoklavirali 20 min pri 121 °C in pri tlaku 1,2 bar. Steriliziranega smo do uporabe shranili v inkubatorju na 28 °C.

Prenos kulture smo naredili po 60-urni kultivaciji kvasovk na stresalniku, pri čemer smo pripravo naredili tako, da se bodo v tem času kvasovke namnožile do celične gostote $5 \cdot 10^8$ celic/mL, kar naj bi ustrezalo vrednosti optične gostote (OD) okrog 2,0. Zato smo pred prenosom izmerili OD na spektrofotometru pri 650 nm. Nato smo aseptično prelili po 50 mL kulture v plastične falkonke s stojnim dnom, jih zaprli in centrifugirali 3 minute pri 4000 obr./min. Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli, pelet, v katerem so bile kvasovke pa smo dobro resuspendirali s pomočjo vrtnika v 50 mL PBS, ogretega na 28 °C. Zatem smo ponovili postopek centrifugiranja in spiranja. Pelet smo tokrat resuspendirali v 50 mL PBS, ki smo ga odmerili s 100-mL steklenim valjem. Zatem smo odmerili 40 mL te suspenzije in jo prelili v 500-mL erlenmajerice z enim utorom, zatem pa dodali še 160 mL sterilnega PBS, ogretega na 28 °C. Končno število celic/mL po razreditvi s PBS je tako bilo okrog $1 \cdot 10^8$. Erlenmajerice smo pokrili s penastim zamaškom in tako pripravljeno kulturo v PBS inkubirali 60 ur pri 220 obr./min in 28 °C. Vse korake pri prenosu kulture smo delali čim hitreje, da ne bi bil to prevelik šok za kvasovke, saj smo želeli ohraniti enaka razmerja in pogoje.

3.3.4 Priprava založnih raztopin antioksidantov in oksidanta menadiona

- Priprava 1 M založne raztopine askorbinske kisline

1 M založno raztopino askorbinske kisline smo pripravili tik pred uporabo, in sicer tako, da smo 0,3523 g askorbinske kisline raztopili v 2-mL filtrirane bidestilirane vode oziroma v tolikih mL, kolikor smo potrebovali končno volumna, vendar, da smo ohranili enako razmerje. Kulturo smo izpostavili 20 mM in 40 mM koncentraciji askorbinske kisline. 20 mM koncentracijo smo dosegli tako, da smo 10 mL kulture dodali 200 µL 1 M založne askorbinske kisline in 400 µL, če smo želeli doseči 40 mM končno koncentracijo askorbinske kisline.

- Priprava 5 mM založne raztopine kvercetina

Pripravili smo jo tako, da smo natančno zatehtali 0,015112 g kvercetina, ki smo ga nato raztopili v 10 mL 80 % etanola. Le-tega smo predhodno pripravili tako, da smo 96 % etanol razredili z bidestilirano vodo (83,3 mL etanola + 16,7 mL ddH₂O). Kvercetin smo raztapljali v temi na vrtniku, tako da smo falkonko pokrili z aluminijsto folijo, ker je občutljiv na svetlobo. Pripravljeno založno raztopino kvercetina smo alikvotirali v 2-mL

Eppendorf mikrocentrifugirke in jih do uporabe shranili v temi na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kulturo smo izpostavili dvema koncentracijama Q. Q₁ (0,05 g/L) smo dobili, e smo 10 mL kulture dodali 335 μL 5mM raztopine kvercetina, Q₂ (0,117 g/L) pa e smo dodali 837 μL .

- Priprava 1M založne raztopine menadiona

Založno raztopino menadiona smo pripravili tako, da smo 0,5525 g menadion natrijevega bisulfita, ki smo ga hranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, raztopili v 2 mL bidestilirane vode, ki smo jo predhodno filtrirali. Raztopina menadiona mora biti sveža, zato smo jo pripravljali tik pred uporabo in hranili v temi (falkonko smo ovili v aluminijasto folijo), ker je tudi menadion ob utljiv na svetlobo.

3.3.5 Izpostavitev kulture askorbinski kislini, kvercetinu in naknadna izpostavitev menadionu

Po 96-ih urah inkubacije kulture v PBS pri 220 obr./min in $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, je bila le-ta pripravljena za izpostavitev antioksidantu oziroma za tretiranje. Delo je potekalo asepti no, pri vsaki seriji tretiranja smo imeli štiriindvajset falkonk s koni nim dnom in pokrov kom, v katere smo najprej odpipetirali po 10 mL kulture. Štiri falkonke so predstavljale kontrolo (kultura brez dodatkov), v naslednje štiri smo dodali samo kulturo in po štirih oziroma štiriindvajsetih urah še 600 μL 1M založne raztopine menadiona, v zadnje štiri pa kulturo, AA ali Q, ter po štirih oziroma štiriindvajsetih urah inkubacije na stresalniku pri 220 obr./min in $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ dodali še 600 μL 1M založne raztopine menadiona. Pred dodatkom menadiona smo kulturo centrifugirali tri minute pri 4000 obr./min, nato supernatant odlili in sprali z 10 mL PBS in zatem ponovili postopek centrifugiranja. Na koncu smo kulturo resuspendirali v 10 mL PBS in dodali 600 μL menadiona, v kontrolo pa smo namesto menadiona dodali kar 600 μL PBS, ter nato vse falkonke inkubirali še dve uri, na stresalniku, pri 220 obr./min in pri temperaturi $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. V celotnem poskusu smo kulturo izpostavili dvema koncentracijama tako Q, kot AA, pri emer smo za vsako koncentracijo naredili po tri biološke ponovitve.

3.3.6 Pobiranje vzorcev in zamrzovanje v teko em dušiku

Po 2-urni inkubaciji kulture na stresalniku je sledilo pobiranje vzorcev. Najprej smo združili vsebino dveh falkonk v eno, tako da smo iz štirih falkonk dobili dve po 20 mL kulture. Zatem smo kulturo centrifugirali tri minute pri 4000 obr./min, supernatant smo odlili, pelet v katerem so bile kvasovke pa sprali s PBS, ogetim na $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, tako da smo ga s pomo jo vrtin nika dobro resuspendirali. Nato smo ponovili postopek centrifugiranja ter supernatant ponovno odlili, pelet pa zamrznili v teko em dušiku pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in do ekstrakcije proteinov shranili v zamrzovalni skrinji na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.7 Izolacija citosolnih in mitohondrijskih proteinov

Citosolne in mitohondrijske proteine smo ekstrahirali z uporabo komercialnega kompleta »Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit (*CalBiochem*) v kombinaciji s centrifugiranjem. Gre za postopek diferencialne detergentne frakcionacije, kjer s pomo jo detergentov dosežemo razbitje celic ter dolo enih organelov (v našem primeru mitohondrijev) in z

diferencialnim centrifugiranjem ločitev citosolne in mitohondrijske frakcije. Postopka smo se lotili tako, da smo najprej iz zamrzovalne skrinje vzeli tretirane pelete kvasovk in sestavine kita ter jih postopoma odtajali na ledu. Medtem smo pripravili 1 x citosolni ekstrakcijski pufer (CP) z red enjem 5 x citosolnega ekstrakcijskega pufera z bidestilirano vodo (ddH₂O). Za 6 vzorcev smo potrebovali 16 mL 1 x citosolnega ekstrakcijskega pufera, pri čemer smo v 8 mL tega pufera dodali proteazni inhibitor (IP) in DTT, ter ga označili s CP⁺, v preostalih 8 mL pufera, pa nismo dodali ničesar in je predstavljal CP⁻, ki smo ga kasneje uporabili za spiranje citosolne frakcije. Dodan DTT vzdržuje proteine v reduciranem stanju, IP pa jih zaščiti pred razgradnjo s proteazami. Na 1 mL pufera smo dodali 2 μL IP in 1 μL DTT. Odtaljen pelet smo resuspendirali v 1250 μL CP⁺ ter ga prenesli v 12,5-mL falkonke z ovalnim dnom. Dodali smo 5 žličk cirkonij-kremen evih kroglic in zatem homogenizirali z mešanjem na vrtniku 5 x po 1 minuto z izmenično 1-minutno inkubacijo na ledu.

Po razbijanju celic smo homogenat centrifugirali 20 min, pri 800 g in 4 °C. V tem koraku naj bi se vsebina celic ločila od cirkonij-kremen evih kroglic in celična debrisa, ki so se usedli na dno. Zato smo v naslednjem koraku 1 mL supernatanta, v katerem je bila vsebina celic, prenesli v 1,5-mL mikrocentrifugirko in ponovili postopek centrifugiranja pri istih pogojih, vendar le 10 minut. V tem koraku se naj bi posedli ostanki plazmaleme, jedra in vakuole, v supernatantu pa naj bi ostal citosol z intaktnimi mitohondriji, zato smo le tega po 900 μL odpipetirali v novo 1,5-mL mikrocentrifugirko. Sledil je korak 30 minutnega centrifugiranja pri 10000 g in 4 °C, ki je bil odločilen, saj smo pričakovali, da se bosta pri teh obratih ločili citosolna in mitohondrijska frakcija, slednjo smo pričakovali v peletu. Zato smo zatem odpipetirali 900 μL supernatanta, ki je predstavljal citosolno frakcijo (v njej smo med drugimi proteini pričakovali predvsem Cu-Zn SOD) v nove 1,5 mL mikrocentrifugirke, ter shranili na ledu do naslednjega centrifugiranja. Najprej smo namreč pelet, v katerem naj bi bili intaktni mitohondriji s povlekom pipete resuspendirali v 1 mL CP⁻ ter nato centrifugirali 10 min pri 10000 g in 4 °C. Supernatant smo zavrgli in ponovili postopek spiranja in centrifugiranja. Po zadnjem spiranju smo mitohondrijski pelet (v njem smo poleg drugih proteinov pričakovali predvsem Mn SOD) raztopili v 50 μL MP⁺. V tem koraku naj bi se sprostila mitohondrijska vsebina. Najprej smo raztopili en pelet ter nato raztopino prenesli k drugemu peletu. Zatem smo na ledu shranjeno citosolno frakcijo centrifugirali 20 minut pri 20000 g in 4 °C, da so se morebitni mitohondriji oz. ostanki le-teh popolnoma posedli in smo dobili v supernatantu isto citosolno frakcijo. Le-to smo po 600 μL prenesli v nove 1,5-mL mikrocentrifugirke. Tako citosolno kot mitohondrijsko frakcijo smo do merjenja aktivnosti SOD in koncentracije proteinov zamrzili na -80 °C.

3.3.8 Merjenje koncentracije proteinov v citosolni in mitohondrijski frakciji (metoda po Bradfordu)

Koncentracijo proteinov smo merili po metodi Bradford. Gre za kolorimetrično določanje koncentracije proteinov, ki temelji na absorbanci barvila Coomassie Brilliant Blue G-250, ki se v kislih pogojih spremeni iz rdečega v moder kompleks, le takšna oblika pa se veže na proteine, ki so prisotni v raztopini (Bradford, 1976). Delo ni potekalo aseptično. Najprej smo

po asi, na ledu odtajali zamrznjeno citosolno in mitohondrijsko frakcijo, medtem pa smo si pripravili 5 x red en Bradford reagent, tako da smo 1 mL koncentriranega Bradford reagenta razred ili s 4 mL ddH₂O. Tako pripravljen reagent obstoji na sobni temperaturi do nekaj ur. Zatem smo razred ili tudi naše vzorce, da so bile izmerjene absorbance v linearnem obmo ju umeritvene krivulje, ki je bila predhodno pripravljena. Obi ajno je bilo potrebno citosolno frakcijo red iti 5x in sicer s CP⁺. Red ili smo tako, da smo 5 µL vzorca dodali 20 µL CP⁺, za slepi vzorec (ne vsebuje ekstrahiranih proteinov) smo vzeli CP⁺. Mitohondrijsko frakcijo smo obi ajno red ili 2x, in sicer smo 5 µL vzorca dodali 5 µL ddH₂O. Za slepi vzorec smo tu uporabili MP⁺, katerega smo prav tako red ili 2x (5 µL MP⁺smo dodali 5µL ddH₂O). Zatem smo si pripravili ra unalniški program za merjenje koncentracije proteinov, pri valovni dolžni 595 nm na italcu mikrotitrskih ploš Safire 2. Nato pa smo pri eli z nanašanjem red enih vzorcev po 4 µL na mikrotitrsko ploš o, pri emer smo pred nanosom vsak vzorec dobro premešali na vrtin niku. Vse vzorce smo nanegli v dveh ponovitvah. Zatem smo v vse luknjice im hitreje dodali 196 µL 5x red enega Bradford reagenta, dobro premešali in inkubirali 5 min na sobni temperaturi. Sledilo je merjenje A pri 595 nm.

3.3.9 Merjenje aktivnosti citosolne (Cu-Zn) in mitohondrijske (Mn) superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnosti obeh SOD v citosolni in mitohondrijski frakciji smo izmerili z uporabo komercialnega kompleta »Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit«. To je zelo ob utljiv komplet reagentov in encima, ki temelji na na inu delovanja SOD. SOD namre katalizira pretvorbo superoksidnega aniona v vodikov peroksid in molekularni kisik. Pomemben sestavni del kompleta je encim ksantin oksidaza, ki tvori superoksidni anion iz kisika. e bo SOD v našem vzorcu/frakciji prisotna, bo opravila svojo nalogo in katalizirala pretvorbo superoksidnega aniona v vodikov peroksid in molekularni kisik, zato superoksidni anion ne bo mogel reducirati WST-1 reagenta, ki smo ga dodali v naš vzorec, do vodotopnega formazana, ki bi bolj absorbiral pri valovni dolžini 450 nm. Koncentracija superoksidnega aniona v zmesi se pove uje zaradi prisotnosti ksantin oksidaze in zmanjšuje zaradi prisotnosti SOD. Torej e bo SOD v frakciji prisotna v zadostni koncentraciji in bo aktivna, bo absorbanca manjša, ker ne bo nastajal formazan, e pa bo v vzorcu malo aktivne SOD, bo superoksidni anion lahko reagiral z WST-1 reagentom in bo nastal vodotopni formazan, zato bo absorbanca ve ja. Pravzaprav gre za reakcijo inhibicije redukcije WST-1 reagenta s strani aktivnosti SOD.

Zgoraj omenjeni komplet je sestavljen iz: reagenta WST, raztopine encima ksantin oksidaze in dveh pufrov, testnega (angl. *SOD Assay Buffer*) in razred itvenega (angl. *SOD Dillution Buffer*). Do uporabe smo ga hranili na 0 – 5 °C, tik pred uporabo pa smo komponente kita segreli na sobno temperaturo. Prav tako smo po asi na ledu odtajali citosolne in mitohondrijske frakcije, ki smo jih hranili na – 80 °C. Medtem smo si pripravili komponente kita po navodilih proizvajalca. WST delovno raztopino smo pripravili tako, da smo 150 µL založni WST raztopini dodali 2850 µL testnega SOD pufra. Delali smo imbolj v temi, ker je WST raztopina ob utljiva na svetlobo. Tako razred ena raztopina je stabilna 2 meseca pri

4 °C. Delovno raztopino encima, pa smo pripravili tako, da smo encim najprej centrifugirali 5 sekund, da so se usedle vse kapljice, ki so bile na stenah, nato pa smo po navodilih proizvajalca dobro premešali na vrtni niku oziroma z izmeni nim povlekom pipete, da sta se obe plasti dobro premešali med sabo. Takoj zatem smo odpipetirali 0,9 µL encima in dodali 150 µL razred itvenega SOD pufera. Tako pripravljena raztopina encima je stabilna 3 tedne pri 4 °C.

Ko smo konali s pripravo delovnih raztopin, smo začeli v temnem prostoru nanašati na prozorno mikrotitrsko ploščo komponente po vrstnem redu, kot je prikazano v Preglednici 2 in inkubirali 20 minut na 37 °C. Medtem ko smo si pripravili računalniški program za merjenje aktivnosti SOD na italcu mikrotitrskih plošč Safire 2 in po končanji inkubaciji izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

Preglednica 2: Postopek nanašanja komponent na mikrotitrsko ploščo za določanje aktivnosti SOD

	vzorec	slepi vzorec 1	slepi vzorec 2	slepi vzorec 3
ekstrakt (µL)	20	-	20	-
ddH₂O (µL)	-	20	-	20
WST-1 raztopina (µL)	200	200	200	200
razred itveni SOD pufer (µL)	-	-	20	20
raztopina encima (µL)	20	20	-	-

V slepi vzorec 1 nismo dodali vzorca, zato v njem ni prisotne SOD, smo pa dodali encim ksantin oksidazo, ki vseeno tvori superoksidni anion iz kisika, vendar le-tega SOD ne porablja, ker je ni, zato pride s strani superoksidnega aniona do redukcije WST-1 raztopine v vodotopen formazan, zato naj bi imel slepi vzorec 1 večjo absorbanco od slepega vzorca 3. Tudi v slepi vzorec 3 nismo dodali vzorca in ksantin oksidaze, ampak samo ddH₂O, WST-1 raztopino in razred itveni SOD pufer. Zato tu reakcija naj ne bi potekla, služil je le zato, da smo lahko odšteli ozadje vseh reagentov. V slepi vzorec 2 pa smo dodali vse razen encima ksantin oksidaze, zato tudi tukaj naj ne bi potekla reakcija, ker ni bilo tvorbe superoksidnega aniona. Ta vzorec nam je služil, da smo odšteli ozadje oz. absorbanco samega ekstrakta proteinov oz. mitohondrijske in citosolne frakcije. Obdelava dobljenih absorbanc s to metodo je prikazana v točki 3.3.10.

3.3.10 Obdelava rezultatov

- Obdelava izmerjenih absorbanc po metodi Bradford pri 595 nm

Absorbance (A), ki smo jih izmerili na italcu mikrotitrskih ploš je bilo potrebno obdelati. Za vsak vzorec in slepi vzorec, ki smo ga nanesli v dveh ponovitvah smo izračunali povprečno A. Nato smo od povprečja A vzorca odšteli povprečje A slepega vzorca. Nato pa smo izračunali koncentracijo proteinov v vzorcu s pomočjo enačbe umeritvene krivulje, ki je prikazana v Prilogi A:

$$y = 0,49689x + 0,01152 \quad \dots (1)$$

$$x = \frac{y - 0,01152}{0,49689} \quad \dots (2)$$

pri čemer x predstavlja koncentracijo proteinov v razrednem vzorcu (g/L), y pa razliko v povprečni absorbanci vzorca in slepega vzorca. Da smo dobili koncentracijo proteinov v nerazrednem vzorcu, smo x pomnožili s faktorjem reditve. Nato smo izračunali še maso proteinov, tako, da smo koncentracijo proteinov v nerazrednem vzorcu pomnožili z volumnom vzorca, ki smo ga kasneje nanašali v jamico mikrotitrskih ploš pri merjenju SOD aktivnosti. Maso proteinov smo uporabili za izračun specifične aktivnosti SOD (aktivnost SOD normalizirana na količino proteinov v merjenem vzorcu).

- Izračun aktivnosti SOD (% inhibicije) iz izmerjenih absorbanc pri 450 nm

Izračunali smo jo za vsako frakcijo in za vsak vzorec po naslednji enačbi:

$$\text{AKTIVNOST SOD} = \frac{(A_{\text{slepa 1}} - A_{\text{slepa 3}}) - (A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepa 2}})}{(A_{\text{slepa 1}} - A_{\text{slepa 3}})} * 100 \quad \dots(3)$$

- Normalizacija aktivnosti SOD glede na koncentracijo proteinov

Aktivnost SOD, ki smo jo izračunali, ni končen rezultat, ker je potrebno pri tem upoštevati koncentracijo oziroma maso proteinov v merjenem vzorcu, zato smo aktivnost SOD, ki smo jo izračunali delili še z maso proteinov in tako dobili absolutne vrednosti specifične aktivnosti SOD v kontroli, v vzorcu tretiranem z menadionom in v vzorcu tretiranem z menadionom in določeno koncentracijo antioksidanta. Te vrednosti so prikazane v Prilogah B in C.

- Relativna specifična aktivnost SOD

Vrednost specifične aktivnosti SOD vzorca, ki smo jo izračunali v prejšnjem koraku, smo delili s specifično aktivnostjo pripadajoče kontrole in rezultat izrazili v odstotkih. Rezultati so prikazani kot relativne vrednosti specifične aktivnosti SOD glede na kontrolo.

- Statistična obdelava rezultatov s t-testom in Duncanovim testom

S t-testom smo preverili domneve o enakosti dveh povprečij. Pri p vrednosti 0,05, je bila razlika med aritmetičnima sredinama statistično značilna. Z njim smo ugotavljali statistično značilne razlike med vzorci tretiranimi z menadionom in kontrolo.

Statistične razlike med različnimi tretiranjmi pa smo ugotavljali z Duncanovim testom mnogoterih primerjav s 95 % intervalom zaupanja.

4 REZULTATI

V sklopu magistrskega dela smo preu evali vpliv dveh eksogenih antioksidantov (kvercetina - Q in askorbinske kisline - AA) na enega izmed endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov – superoksid dismutazo (SOD), in sicer: Cu-Zn in Mn SOD, na modelnem organizmu *Saccharomyces cerevisiae*. Kulturo kvasovk smo najprej namnožili v gojišču u YEPD do stacionarne faze rasti, nato inkubirali v pufru PBS, zatem pa predretirali z dvema koncentracijama posameznih antioksidantov 4 in 24 h ter naknadno izpostavili menadionu za 2 h (Q1M, Q2M; AA1M, AA2M). Kot primerjavo smo vzeli kulturo celic, ki ni bila predretirana, vendar samo izpostavljena menadionu (M). Z razbijanjem celic in diferencialno detergentno frakcionacijo smo izolirali citosolno in mitohondrijsko frakcijo, kjer smo merili aktivnost posameznih SOD. Menadion smo uporabili kot oksidant, za katerega je znano, da tvori superoksidne radikale, še posebno v mitohondrijih, kjer se nahaja Mn SOD. Pri prejetju enega elektrona, katerega vir je najve krat mitohondrijska respiratorna veriga, nastane radikal semikinona, ki se zaradi nestabilnosti ob prisotnosti kisika avtooksidira, pri emer se tvorita superoksidni anion in kinon (Monks in Jones, 2002; Chung in sod., 1999). Ker se pove a nivo oksidantov v celici, kvasovka to zazna in sproži se endogeni antioksidativni obrambni sistem.

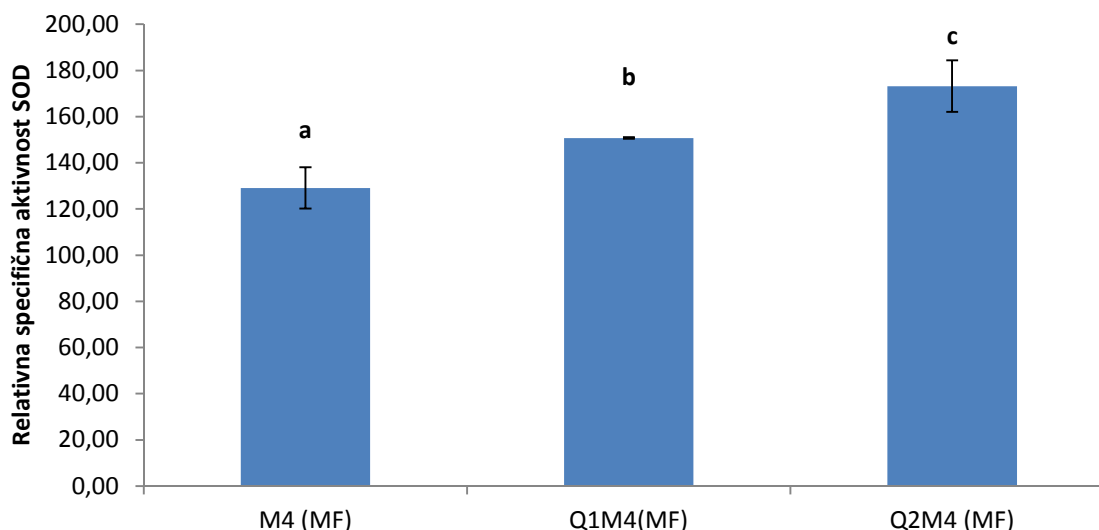
Naši rezultati so pokazali, da se je pri kulturi, ki ni bila predretirana z antioksidantom in je bila za dve uri izpostavljena samo oksidantu menadionu, zvišala aktivnost Mn SOD v primerjavi s kontrolo (netretirano kulturo), saj se vrednosti statisti no zna ilno razlikujejo od kontrole pri $p = 0,02198$ po 4 h in pri $p = 0,01019$ po 24 h. V primeru citosolne frakcije se pri kulturi, ki je bila izpostavljena samo menadionu, aktivnost Cu-Zn SOD ni povišala v primerjavi s kontrolo (netretirano kulturo), saj smo s t-testom ugotovili, da se vrednosti statisti no zna ilno ne razlikujejo pri $p = 0,05$ ($p = 0,91671$ po 4 h; $p = 0,0518$ po 24 h). Mogo e je vzrok v tem, da gre tu za citosolno frakcijo, kjer se menadion ne zadržuje oziroma ne deluje v takšni meri, kot pa v mitohondrijih, zato smo v mitohondrijski frakciji opazili povišano aktivnost Mn SOD. Monteiro in sod. (2013) so namre dokazali, da se menadion vklju i v membranske sisteme, sestavljene iz enojnih fosfolipidov (fosfatidilholina) in tudi v mitohondrijske membrane ter s tem spremeni organizacijo lipidov in fluidnost membran.

V našem primeru smo celice izpostavili menadionu 2 h in izmerili povišano aktivnost Mn SOD. Kdaj je bila aktivnost najve ja, je težko napovedati. Kim in sod. (2006) so namre z imunoblot analizo preu evali izražanje antioksidativnih encimov kot odgovor na oksidativni stres, povzro en z menadionom in so specifi no aktivnost antioksidativnih encimov opazili že po trideset minutni izpostavitvi menadionu. Ugotovili so, da se je izražanje Cu-Zn SOD mo no pove alo po izpostavitvi $120 \mu\text{M}$ menadionu, po adaptaciji pa spremembe v izražanju niso bile ve vidne. Pri Mn SOD pa niso opazili sprememb med in po adaptaciji. Isti avtorji so leta 2011 nadaljevali preiskovanje sposobnosti adaptacije celi ne redoks homeostaze na z menadionom povzro en oksidativni stres v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, z uporabo

biokemi nih in proteomskih pristopov v odvisnosti od H_2O_2 koncentracije. Ugotovili so, da je H_2O_2 odvisna celi na viabilnost obratno sorazmerna z endogenimi koli inami ROS in da so celice najbolj odzivne po eni uri izpostavitve menadionu, medtem ko je bila viabilnost celic po dveh urah že povišana nazaj na raven podobno kontroli (kulturi, ki ni bila izpostavljena menadionu). Njihovi rezultati so namre pokazali, da strategije zaš ite celic kvasovk sovpadajo s preživetjem celic skozi različne stopnje izpostavitve menadionu in s pove ano sintezo celi nih zaš itnih proteinov, pod vplivom menadiona (Kim in sod., 2011).

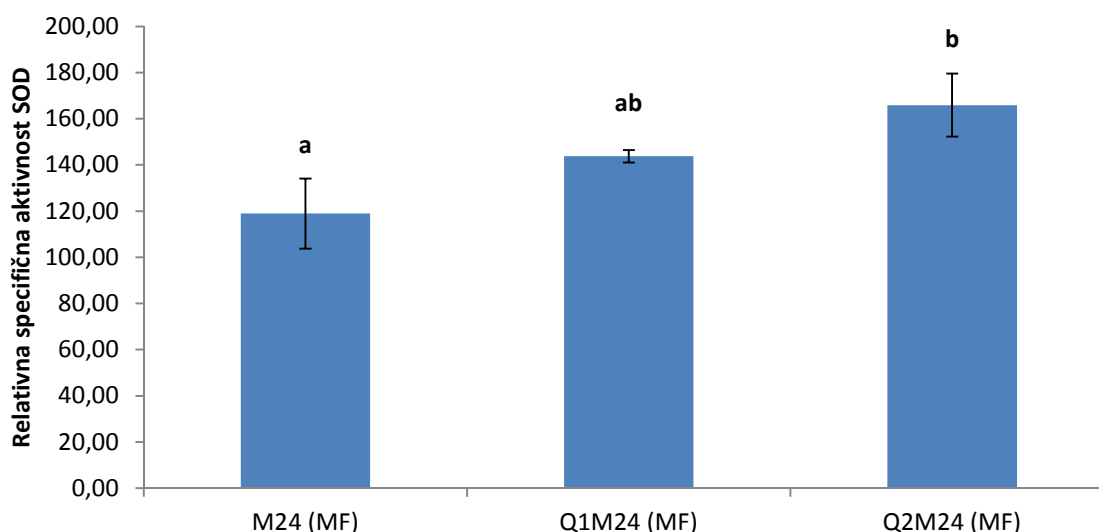
4.1 PREU EVANJE VPLIVA PREDTRETIRANJA CELIC S KVERCETINOM NA AKTIVNOST Mn in Cu-Zn SOD

4.1.1 Vpliv na aktivnost Mn SOD



Slika 5: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).

Rezultati so predstavljeni kot povpre je relativnih specifi nih aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povpre ne relativne vrednosti, ki so ob istem H_2O_2 merjenju ozna ene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

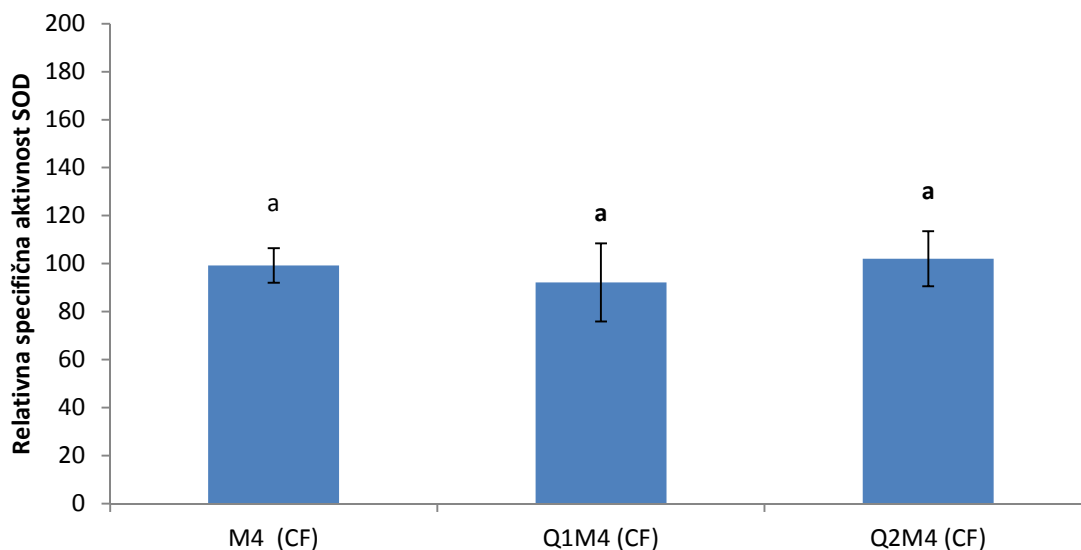


Slika 6: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

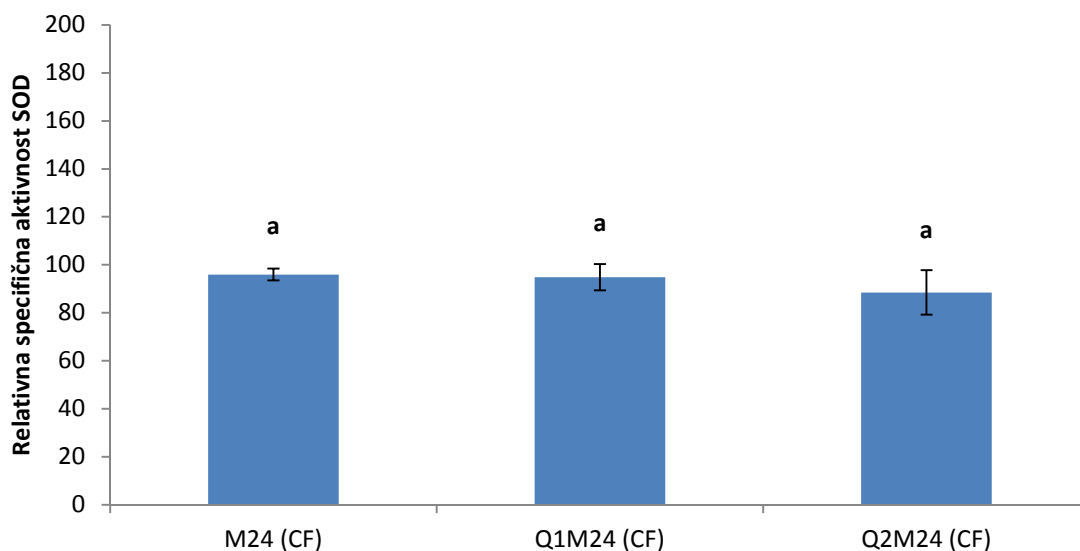
Če smo kulturo najprej za 4 h izpostavili kvercetinu ter nato še za dve uri menadionu, se je aktivnost Mn SOD povečala v primerjavi s kulturo, ki je bila izpostavljena samo menadionu. In sicer se je po 4-urnem predtretiranju zvišala za 22 % pri prvi koncentraciji kvercetina (0,05 g/L) ter za 44 % pri drugi koncentraciji (0,117 g/L). Po 24-urnem predtretiranju pa se je pri nižji koncentraciji zvišala za 25 %, kar sicer ni bilo statistično značilno glede na kontrolo, ki je bila izpostavljena samo menadionu, ter za 47 % pri višji koncentraciji kvercetina. Tudi kvercetin sam lahko direktno vpliva na povišanje aktivnosti SOD, ko reagira s superoksidnim radikalom, nastane radikal semikinona in vodikov peroksid. Radikal semikinona je nestabilen, zato se oksidira do kvercetin-kinona, ki pa je zelo reaktiven (Metodiewa in sod., 1999). Produkt reakcije je tudi superoksidni radikal, ki je lahko potem substrat za SOD ali za kateri drugi endogeni antioksidant (npr. glutation) ali pa ponovno za kvercetin.

4.1.2 Vpliv na aktivnost Cu-Zn SOD



Slika 7: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.



Slika 8: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

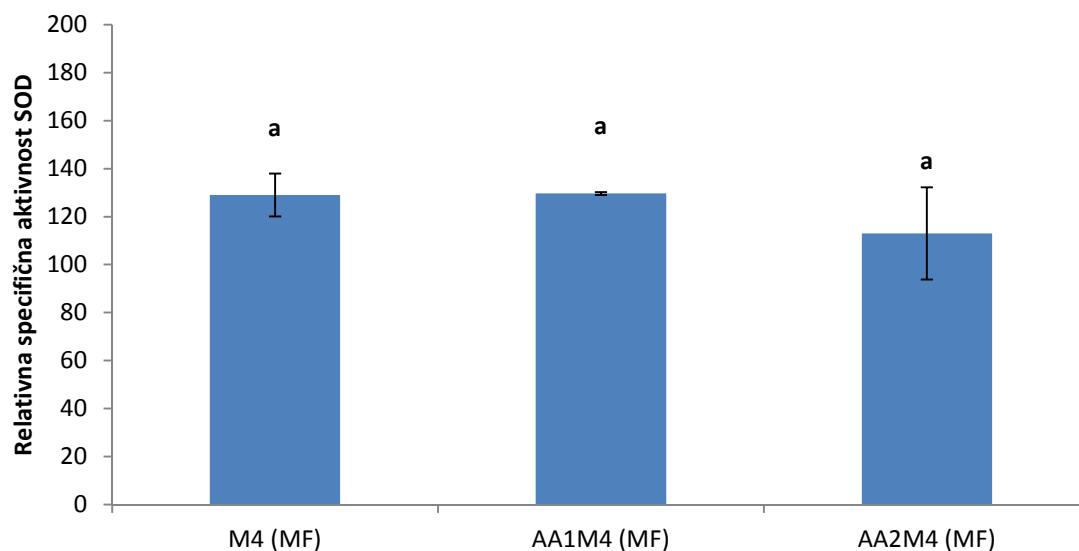
e vzamemo v obzir citosolno Cu-Zn SOD, vidimo, da pri kulturi, ki je bila predtretirana s kvercetinom in naknadno izpostavljena menadionu, ni opazne povišane aktivnosti Cu-Zn SOD v primerjavi s kulturo, ki je bila izpostavljena samo menadionu. Duncan test namre ni pokazal statistično značilnih razlik. Lahko rečemo, da kvercetin verjetno nima bistvenega vpliva na Cu-Zn SOD, medtem, ko smo opazili, da na Mn SOD vpliva. Eden izmed razlogov je gotovo ta, da je kvercetin lipofilen in zato verjetno ne deluje v tolikšni meri v citosolni frakciji, kakor pa v mitohondrijih, kjer reagira in se veže z lipofilnimi membranami.

Tudi med različnimi koncentracijama kvercetina ni opaznih statistično značilnih razlik v aktivnosti Cu-Zn SOD, pri obeh koncentracijah kvercetina je namre aktivnost nekje na ravni kulture, ki je bila izpostavljena samo oksidantu menadionu, medtem ko smo pri Mn SOD opazili ravno nasprotno, da ima koncentracija kvercetina določen vpliv na aktivnost.

Zakrajšek (2014), ki je v svoji raziskavi merila totalno aktivnost SOD, pa je pokazala, da je aktivnost SOD v celicah predtretiranih s kvercetinom (Q1) in naknadno izpostavljenih menadionu, primerljiva (4h) oz. nižja (24 h) v primerjavi s kulturo, ki je bila izpostavljena samo menadionu. Glede na to lahko zaključimo, da je bil v totalni aktivnosti SOD razviden le prispevek aktivnosti Cu-Zn SOD.

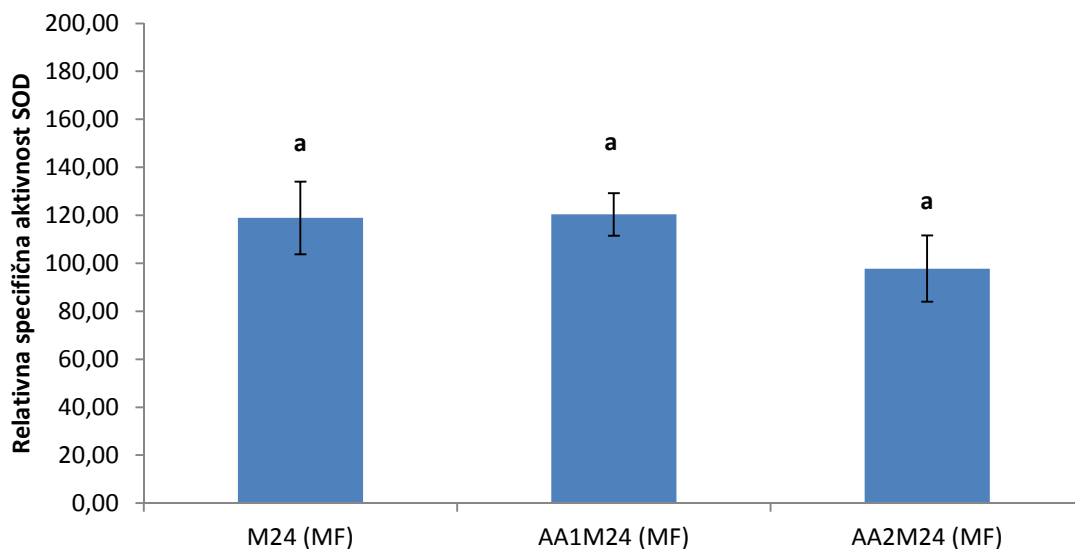
4.2 PREUŠEVANJE VPLIVA PREDTRETIRANJA CELIC Z ASKORBINSKO KISLINO NA AKTIVNOST Mn in Cu-Zn SOD

4.2.1 Vpliv na aktivnost Mn SOD



Slika 9: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA₁ in AA₂) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti ± sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

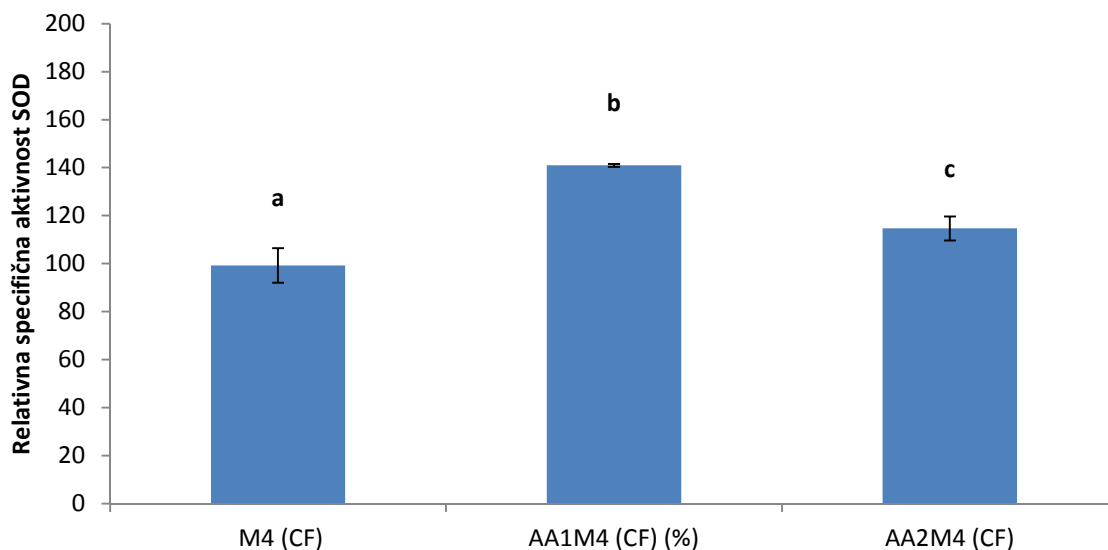


Slika 10: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA₁ in AA₂) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD (mitohondrijska frakcija – MF).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

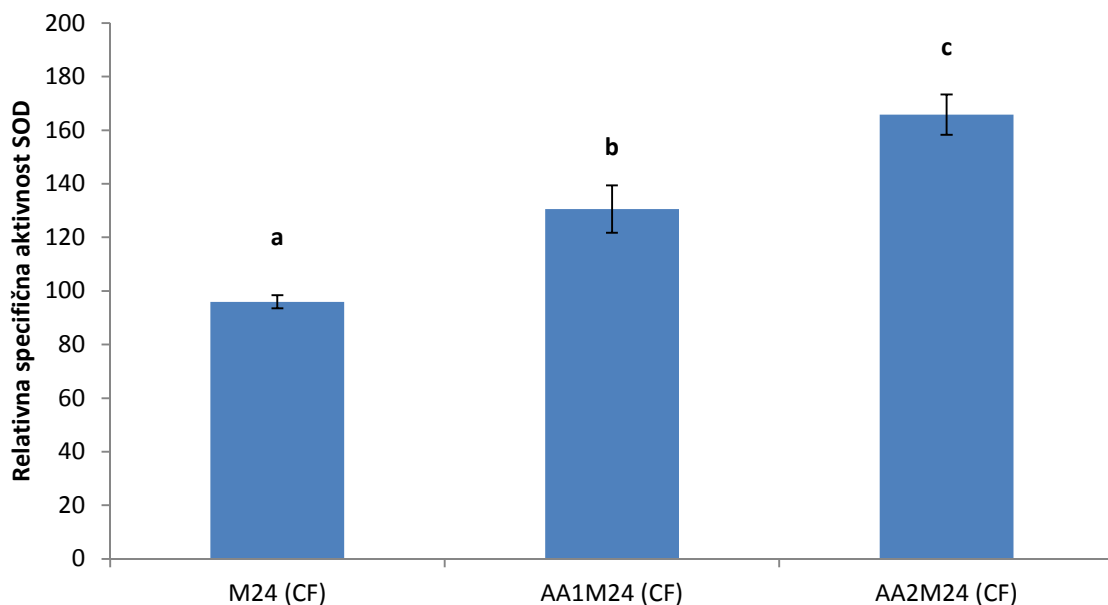
Če je bila kultura 4h predtretirana z askorbinsko kislino in naknadno izpostavljena menadionu, ni opaznih statistično značilnih razlik v aktivnosti Mn SOD, v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana, temveč samo izpostavljena menadionu. Med prvo in drugo koncentracijo AA so opazne le manjše razlike v aktivnosti Mn SOD, ki pa niso statistično značilne.

4.2.2 Vpliv na aktivnost Cu-Zn SOD



Slika 11: Vpliv 4-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA₁ in AA₂) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.



Slika 12: Vpliv 24-urnega predtretiranja celic kvasovke z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA₁ in AA₂) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD (citosolna frakcija – CF).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

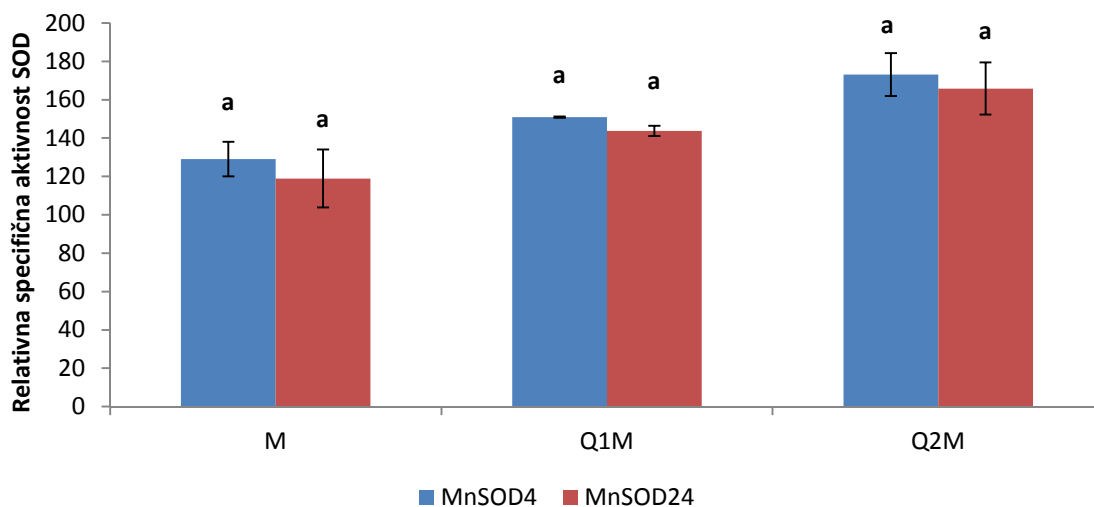
e primerjamo rezultate (Slika 11, 12) z rezultati na Sliki 9 in 10, je razvidno, da ima askorbinska kislina veji vpliv na Cu-Zn SOD kot na Mn SOD, saj se je aktivnost Cu-Zn SOD bistveno bolj povečala pri predtretirani kulturi z AA v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana. To si lahko razlagamo s tem, da je AA vodotopen vitamin, antioksidant in ga je največ v citosolni frakciji, zato se njegovo delovanje odraža predvsem na povišani aktivnosti Cu-Zn SOD, ki se nahaja v citosolu. In sicer se je aktivnost Cu-Zn SOD po 4-urnem predtretiranju povečala za 42 % pri prvi koncentraciji AA (20 mM AA), medtem ko se je pri drugi koncentraciji AA (40 mM) povečala le za okoli 15 % v primerjavi s kulturo, izpostavljeno samo menadionu. Iz tega sklepamo, da je morda 40 mM koncentracija AA že prevelika in sproži ravno nasprotno učinke. Po 24-urnem predtretiranju, pa se je namreč tudi pri višji koncentraciji AA aktivnost SOD povečala, in to kar za okoli 70 % v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana, ampak izpostavljena samo menadionu. Morda zato, ker je 24-urni interval daljši, da se popravijo oksidativne poškodbe in se odpravi tisti začetni stres, ter se to odrazi na povišani aktivnosti Cu-Zn SOD. Pri prvi koncentraciji AA pa se je tudi po 24-ih urah aktivnost povečala, za 35 % v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana, kar je nekje na isti ravni, kakor po 4-urnem predtretiranju, v tem primeru se ne opazi bistven vpliv časovne razlike.

Sklenemo lahko, da je aktivnost Cu-Zn SOD v celicah, ki so bile predtretirane z AA višja, kot pri kulturi, ki ni bila predtretirana, kar bi lahko pojasnili s prooksidativnim delovanjem askorbinske kisline.

e primerjamo naše rezultate z rezultati, ki jih v svoji nalogi navaja Zakrajšek (2014), lahko ponovno opazimo veji prispevek aktivnosti Cu-Zn SOD k totalni aktivnosti SOD. Namreč, totalna aktivnost SOD kulture, ki je bila 4 ure predtretirana z askorbinsko kislino (AA1) je bila višja kot pri kulturi, ki predhodno ni bila tretirana. V primeru 24 urnega predtretiranja pa je bila aktivnost SOD pri obeh kulturah enaka.

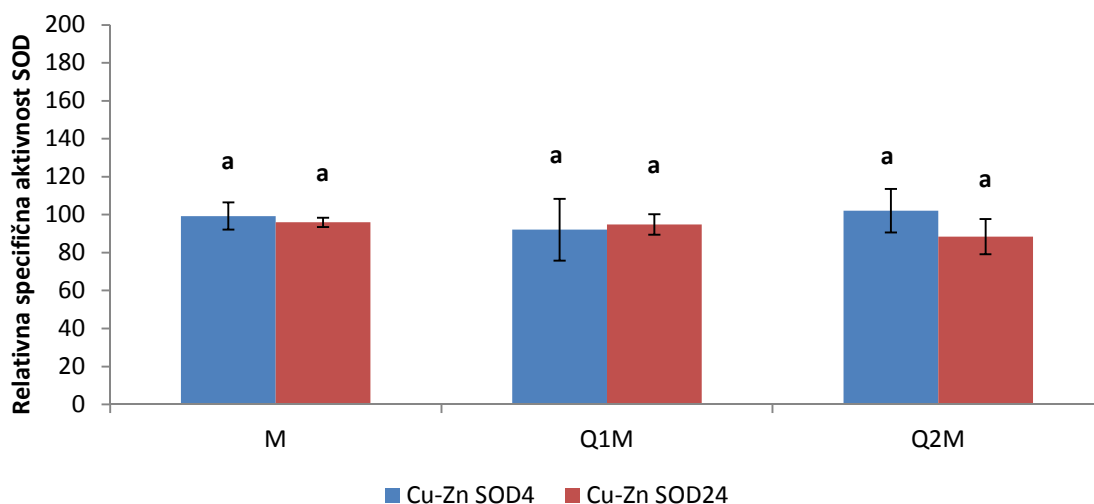
4.3 ASOVNA PRIMERJAVA PREDTRETIRANJ Z ANTIOKSIDANTOMA

4.3.1 Vpliv asa predtretiranja celic s kvercetinom na aktivnost Mn SOD



Slika 13: Vpliv asa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke *S. cerevisiae* z dvema različnima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD. Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

4.3.2 Vpliv asa predtretiranja celic s kvercetinom na aktivnost Cu-Zn SOD

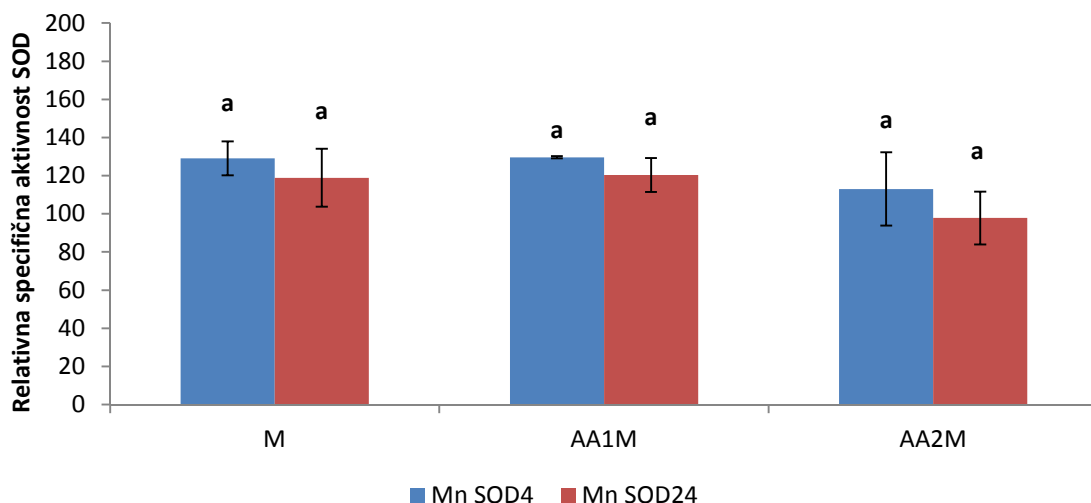


Slika 14: Vpliv asa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke *S. cerevisiae* z dvema različnima koncentracijama kvercetina (Q_1 in Q_2) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD.

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

Tako pri Mn kot Cu-Zn SOD so rezultati pokazali, da čas predtretiranja celic s kvercetinom ne vpliva na aktivnost Mn SOD. Tudi Zakrajšek (2014) je v svoji doktorski disertaciji dobila podobne rezultate, kljub temu, da je merila totalno aktivnost SOD, ne posameznih SOD. Ugotovila je, da se aktivnost SOD po 4-urnem predtretiranju s kvercetinom poveča za 13 %, po 24-urnem pa za 12 %, torej ne gre za razliko v času tretiranja.

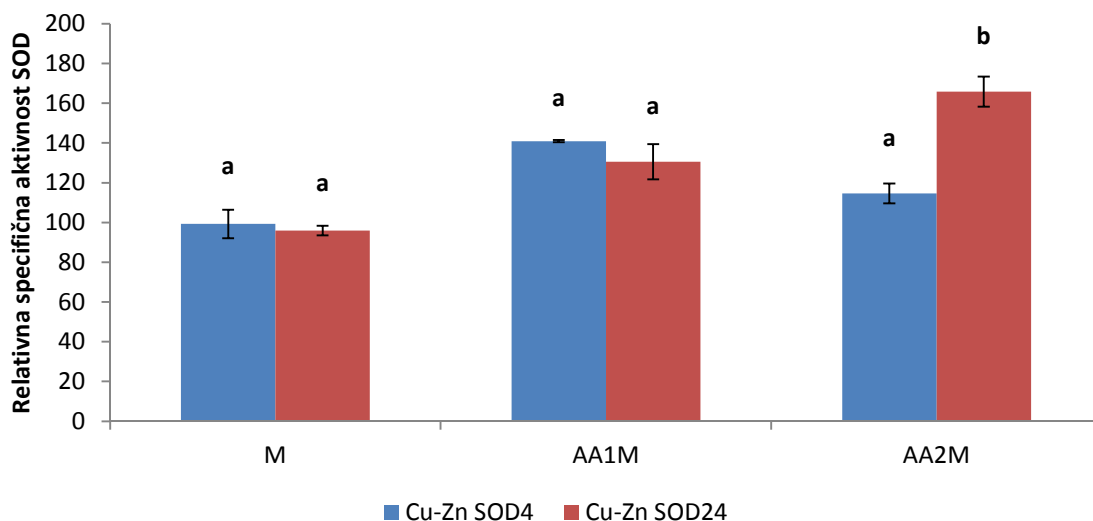
4.3.3 Vpliv časa predtretiranja celic z askorbinsko kislino na aktivnost Mn SOD



Slika 15: Vpliv časa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke *S. cerevisiae* z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA₁ in AA₂) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Mn SOD.

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

4.3.4 Vpliv časa predtretiranja celic z askorbinsko kislino na aktivnost Cu-Zn SOD



Slika 16: Vpliv časa predtretiranja (4 in 24 h) celic kvasovke *S. cerevisiae* z dvema različnima koncentracijama askorbinske kisline (AA₁ in AA₂) ter naknadne 2-urne izpostavitve induktorju stresa-menadionu (M) na aktivnost Cu-Zn SOD.

Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne specifične aktivnosti \pm sd vsaj dveh bioloških ponovitev. Povprečne relativne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b), se med seboj razlikujejo.

Tudi v celicah, ki so bile predtretirane z askorbinsko kislino, čas predtretiranja ni pokazal statistično značilnega vpliva na aktivnost Mn in Cu-Zn SOD, izjema je le 40 mM koncentracija, kjer je aktivnost Cu-Zn SOD po 24-ih urah predtretiranja (AA₂M, rdeči stolpec) višja v primerjavi s 4-urno izpostavitvijo (AA₂M, modri stolpec). Zakaj takšna razlika, je težko pojasniti. Ena možnih razlag je ta, da ima askorbinska kislina večji vpliv na aktivnost Cu-Zn SOD, kakor pa na Mn SOD, verjetno zato, ker je vodotopna in se zato zadržuje v citosolni frakciji, kjer se nahaja Cu-Zn SOD. Vsekakor pa ne moremo iz tega potrditi, da ima časovna razlika takšen vpliv samo v tem primeru, drugje pa razlike ni. Za boljše razumevanje te razlike bi bilo potrebno narediti še več bioloških ponovitev, pregledati več časovnih intervalov (na primer meriti aktivnost na 30 min izpostavitve) ter se usmeriti prav na časovni vpliv, kar pa ni bil prednostni cilj naše naloge.

5 RAZPRAVA

Izhodiš e tega magistrskega dela je bila predhodna raziskava (Zakrajšek, 2014), kjer je bil med drugim preu evan tudi vpliv predtretiranja celic s kvercetinom ali askorbinsko kislino in naknadne izpostavitve menadionu na totalno aktivnost SOD. V naši nalogi pa smo preverili, kako se predtretiranje celic s posameznima antioksidantoma (kvercetin, askorbinska kislina) in naknadna izpostavitvev menadionu odraža na aktivnosti posameznih SOD (Cu-Zn in Mn SOD).

Na za etku magistrskega dela smo postavili dve klju ni hipotezi. Hipotezo 1, v kateri smo predvidevali, da se bosta aktivnosti Cu-Zn SOD in Mn SOD med seboj razlikovali v primeru predtretiranja celic s posameznim antioksidantom, smo s pridobljenimi rezultati potrdili. Vpliv obeh antioksidantov je razviden na ravni obeh SOD, pri meru lahko izpostavimo, da se je izkazalo, da ima predtretiranje celic s kvercetinom ve ji vpliv na aktivnost Mn SOD, medtem ko ima predtretiranje z askorbinsko kislino ve ji vpliv na aktivnost Cu-Zn SOD. Pokazale so se tudi razlike med koncentracijama u inkovine, npr. ve ja koncentracija AA (40 mM AA) je rezultirala v ve ji aktivnosti Cu-Zn SOD, kot manjša koncentracija (20 mM AA). V hipotezi 2 pa smo predvidevali, da se bo predtretiranje celic s kvercetinom druga e odrazilo na ravni Cu-Zn SOD in Mn SOD kot predtretiranje z AA, kar pa smo tudi potrdili in že obrazložili pri posami nih grafikonih. Rezultati so logi ni, saj se Mn SOD in Cu-Zn SOD razlikujeta med sabo tako po mestu nahajanja in delovanja v celicah, kakor tudi po fizikalno-kemijskih lastnostih.

Spraševali smo se tudi, ali kvercetin in askorbinska kislina delujeta bodisi antioksidativno, bodisi prooksidativno. Prooksidanti so definirani kot snovi, ki povzro ajo oksidativni stres, obi ajno s tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti ali z zaviranjem antioksidativnih sistemov (Puglia in Powell, 1984). Prosti radikali naj bi bili torej prooksidanti, vendar, presenetljivo, tudi antioksidanti imajo lahko prooksidativno delovanje. Na primer, vitamin C je mo an antioksidant, vendar lahko postane tudi prooksidant, ko reagira z železovimi ali bakrovimi ioni in jih reducira, pri meru se reducira tudi vodikov peroksid v hidroksilne radikale (Duarte in Lunec, 2005). Tudi flavonoidi naj bi imeli prooksidativno delovanje, vendar v odvisnosti od okoljskih dejavnikov. Tako naj bi fenoli, ki se nahajajo v živilih, delovali prooksidativno v sistemih, ki vsebujejo redoks aktivne kovine. Prisotnost kisika in prehajanje kovin, kot sta železo in baker, katalizirajo redoks kroženje fenolov in lahko vodijo do tvorbe ROS ter fenoksilnih radikalov, ki poškodujejo DNA, lipide in druge biološke molekule (Galati in O'Brien, 2004).

Na osnovi pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da tako kvercetin kot askorbinska kislina delujeta tako antioksidativno kot tudi prooksidativno, odvisno od pogojev. Prooksidativno delovanje pomeni, da zvišata oziroma oja ata oksidativni stres, ter s tem posredno spodbudita delovanje endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov, v našem primeru pride do povišanja aktivnosti SOD. Tudi Zakrajšek (2014) je v svoji doktorski disertaciji

potrdila, da že samo predtretiranje s kvercetinom poveča totalno aktivnost SOD. Vpliv kvercetina se je pri nas odrazil v zvišanju aktivnosti Mn SOD. Kvercetin sicer ne deluje kot antioksidant, saj ob reakciji z superoksidnim anionom nastane semikinonski radikal. Vendar ta ni stabilen in se ponovno oksidira do kvercetin-kinona, zraven pa nastane še superoksidni radikal (Awad in sod., 2000; Jorgensen in sod., 1998). Ta pa povzroča oksidativne poškodbe, torej je kvercetin na nek način deloval prooksidativno, saj je povzročil nastanek superoksidnega aniona. Poleg tega lahko kvercetin-kinon reagira s tiolnimi skupinami glutationa ali proteinov. Če je glutationa v celici dovolj, bo prednostno reagiral z njim, če ne pa s proteini, torej bi povzročil oksidativne poškodbe, kar pomeni, da bi deloval prooksidativno. Lahko bi rekli, da sam kvercetin ne deluje prooksidativno, vendar le njegovi oksidativni produkti, za katere je znano, da imajo različne toksične učinke, ker lahko reagirajo s proteinskimi tioli (Kalyanaraman in sod., 1987; Ito in sod., 1988; Monks in sod., 1992; Metodiewa in sod., 1999). To delovanje pa je odvisno od koncentracije antioksidanta ter tudi od ostalih fizikalno-kemijskih dejavnikov. Čeprav polifenoli, med katere sodi tudi kvercetin, nimajo značilno izražene *in vivo* antioksidativne sposobnosti v konvencionalnem smislu, pa številne študije dokazujejo, da lahko ščitijo celice pred oksidativnim stresom *in vitro* pod fiziološko relevantnimi koncentracijami. Študije celo nakazujejo, da naj bi polifenoli inducirali povišano izražanje endogenih antioksidativnih encimov *in vivo* in naj bi tako imeli posreden antioksidativni učinek (Stevenson in Hurst, 2007). Podobno velja tudi za askorbinsko kislino. Tudi naši pridobljeni rezultati so nakazali na to, saj je v pogojih oksidativnega stresa, povzročena z menadionom, delovanje askorbinske kisline rezultiralo v povišani aktivnosti predvsem Cu-Zn SOD, kar smo pojasnili s prooksidativnim delovanjem. Poraja se nam vprašanje, ali bi bila kvercetin in askorbinska kislina dobra antioksidanta v zaščiti pred oksidativnim stresom. Da bi lahko to potrdili, bi morali spremljati tudi viabilnost celic oziroma kultivabilnost celic, kar je med drugim merila tudi Zakrajšek (2014). Po predtretiranju celic z antioksidantom je opazila, da kvercetin ugodno deluje na kultivabilnost celic, saj jo je zvišal, medtem ko je askorbinska kislina po daljšem času predtretiranja kultivabilnost znižala. Kot razlog je navedeno citotoksično delovanje AA pri visokih koncentracijah, najverjetneje zaradi prooksidativnega delovanja (Zakrajšek, 2014). Na podlagi tega bi lahko zaključili, da najverjetneje v tem primeru predtretiranje ni bilo zadostno in ni pripomoglo k zaščiti pred oksidativnim stresom.

Podobno so tudi Krasowska in sod. (2003) pokazali, da vitamina A in E kot tudi kvercetin delujejo prooksidativno na kvasne celice v pogojih oksidativnega stresa, povzročena z uporabo parakvata. Tudi Sakagami in sod. (2000) so ugotovili, da ima vitamin C prooksidativno delovanje v prisotnosti kovinskih ionov, kjer deluje kot reducirajoči agent, da zagotovi katalizatorje za Fentonovo reakcijo. Torej nizka koncentracija AA ojača aktivnost kisikovih radikalov, medtem, ko v primeru visokih koncentracij pride do lovljenja hidroksilnih radikalov, superoksidnih radikalov in lipidnih peroksidov.

Iz naših pridobljenih rezultatov in podatkov iz literature lahko strnemo, da je vloga eksogeno dodanih antioksidantov v zaščiti celic pred oksidativnim stresom na ravni enega izmed

endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov (citosolne in mitohondrijske superoksid dismutaze) razli na in odvisna od tipa antioksidanta, njegovih fizikalno-kemijskih lastnosti, mehanizma delovanja in koncentracije, od asa izpostavitve, od prisotnosti in vrste oksidanta ter tudi od tipa celic, na katerih preu ujemo delovanje antioksidantov. V našem primeru smo kot modelni organizem uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki je najbolj enostaven evkariontski model, nezahteven za kultivacijo in ima hkrati veliko podobnosti z višjimi evkarionti (Kim in sod., 2006).

Antioksidantov ne moremo na splošno razumeti kot zgolj samo koristne ali v drugi skrajnosti kot škodljive. Drži, da so se dolo eni antioksidanti v mnogih primerih izkazali kot koristni mehanizmi oziroma kot dobri v zaš iti celic pred oksidativnim stresom. To smo delno z našimi rezultati magistrske naloge potrdili tudi mi, saj se je v dolo enih primerih pod vplivom dolo enega antioksidanta zvišala aktivnost SOD, torej imajo eksogeni antioksidanti dolo en vpliv na endogeno antioksidativno obrambo. Vendar gotovo obstaja neka meja v koncentraciji zaužitega antioksidanta, nad katero se dogajanje lahko obrne celo v negativno smer, ko nivo oksidantov v celici preseže endogeno antioksidativno obrambo, kar vodi v kopi enje oksidativnih poškodb celi nih komponent. Zato je potrebno upoštevati, da sicer so, dokazano, lahko koristni, vendar v dolo enih koncentracijah. Pretirano in nenadzorovano uživanje antioksidantov po nepotrebnem tako nima le pozitivnih u inkov. To še zlasti velja v primeru uživanja le-teh v obliki prehranskih dopolnil. Ta namre na trgu niso nadzorovana in klini no testirana, zato mnogokrat sploh ne vsebujejo u inkovine v koli ini, ki je deklarirana ali pa niso varna.

V zadnjih letih so bili prehranski antioksidanti še posebno preu evani in domneva se, da se ve ina antioksidantov obnaša kot prooksidanti, vendar vse zavisi od njihove koncentracije in narave sosednjih molekul (Villanueva in Kross, 2012). Za maksimalno razstrupljanje in lovljenje ter izlo anje ROS v zunajceli ni matriks pa bi bile potrebne razli ne kombinacije antioksidantov z razli nimi redoks potenciali in organelno specifi nostjo. Na primer, uporaba kvercetina v kombinaciji z resveratrolom deluje sinergisti no in uspešno znižuje debelost, e je le-ta definirana kot stanje kroni nega oksidativnega stresa (Yang in sod., 2008). Preu evanje kombiniranega delovanja antioksidantov v zaš iti pred oksidativnim stresom je tako morda ena dobrih izto nic za nadaljnje raziskave na tem podro ju v prihodnosti.

6 SKLEPI

- Izpostavitve celic menadionu poveča aktivnost Mn SOD v primerjavi s kontrolo, medtem ko nima vpliva na aktivnost Cu-Zn SOD.
- Predtretiranje celic s kvercetinom in naknadna izpostavitve menadionu poveča aktivnost Mn SOD v primerjavi s kulturo, ki je bila izpostavljena samo menadionu. Na aktivnost Cu-Zn SOD pa predtretiranje s kvercetinom nima vpliva. Vpliv kvercetina je koncentracijsko odvisen.
- Predtretiranje celic z askorbinsko kislino in naknadna izpostavitve menadionu poveča aktivnost Cu-Zn SOD v primerjavi s kulturo, ki je bila izpostavljena samo menadionu, medtem ko vpliva na aktivnost Mn SOD nismo zaznali. Vpliv askorbinske kisline je koncentracijsko odvisen.
- Če predtretiranja celic (4 oz. 24 h) z antioksidantoma se ni izkazal kot pomemben dejavnik vpliva na aktivnost tako Cu-Zn kot tudi Mn SOD.
- Rezultati nakazujejo, da se Mn SOD bolj odziva na kvercetin, Cu-Zn SOD pa bolj na askorbinsko kislino.

7 POVZETEK

Med aerobnim metabolizmom nastaja širok spekter reaktivnih kisikovih (ROS) in drugih zvrsti, ki se razgrajujejo z različnimi endogenimi antioksidativnimi obrambami. Ko pa le-ta ni dovolj uspešna in pride do prevelike proizvodnje ROS na eni strani ter pomanjkanja obrambe na drugi strani, nastane oksidativni stres. Ta je definiran kot stanje porušenega ravnovesja v organizmu med antioksidanti in oksidanti, ki ga spremljajo številne poškodbe celičnih struktur, nukleinskih kislin, lipidov in proteinov. Antioksidanti so spojine, ki so prisotne v nizkih koncentracijah v primerjavi s substratom, ki je na voljo oksidacijam, potem preprečujejo ali zavirajo oksidacijo tega substrata. Poznamo endogeno in eksogeno antioksidativno obrambo. Endogeno delimo na encimsko in neencimsko. Med encimsko obrambo ločimo primarno, ki nevtralizira ROS (npr. superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza, itd.) ter sekundarno, ki popravlja in odstranjuje poškodovane molekule. Kljub dokazani učinkovitosti endogene antioksidativne obrambe ta pogosto ne zadostuje, zato so potrebni tudi eksogeni antioksidanti, prisotni v hrani, kot sta askorbinska kislina in kvercetin. Nekateri znanstveniki poročajo tudi o prooksidativnem delovanju antioksidantov, kar pomeni, da naj bi povečevali stopnjo oksidativnih poškodb in bili s tem posredno koristni, ker naj bi na ta način spodbudili delovanje endogene antioksidativne obrambe. Vendar je na delovanje antioksidantov odvisen od več dejavnikov: vrste, koncentracije, obsega izpostavljenosti, itd.

Cilj magistrskega dela je bil preveriti vpliv predtretiranja celic kvasovke *S. cerevisiae* s kvercetinom in askorbinsko kislino in naknadne izpostavitve menadionu na aktivnost citosolne (Cu-Zn SOD) in mitohondrijske (Mn SOD) superoksid dismutaze. Kulturo kvasovk smo najprej namnožili v gojišču YEPD do stacionarne faze rasti (60-h kultivacija), zatem inkubirali v pufru PBS 96 h in nato predtretirali celice 4 oz. 24 h z dvema koncentracijama kvercetina (0,05 in 0,117 g/L) in askorbinske kisline (20 in 40 mM) ter naknadno izpostavili menadionu za 2 h. Kot primerjavo smo vzeli kulturo celic, ki ni bila predtretirana, vendar samo izpostavljena menadionu. Menadion smo uporabili kot oksidant. Z razbijanjem celic in diferencialno detergentno frakcionacijo ter centrifugiranjem smo nato izolirali citosolno in mitohondrijsko frakcijo, kjer smo s pomočjo komercialnega kompleta merili aktivnost posameznih SOD. Za izračun specifične aktivnosti SOD smo določili še koncentracijo izoliranih proteinov po metodi Bradford. Pridobljene rezultate smo statistično obdelali s t-testom in Duncanovim testom.

Rezultati so pokazali, da izpostavitve celic samo menadionu povečajo aktivnost Mn SOD v primerjavi s kontrolo, medtem ko nima vpliva na aktivnost Cu-Zn SOD. Predtretiranje celic s kvercetinom in naknadna izpostavitve menadionu povečajo aktivnost Mn SOD v primerjavi s kulturo, ki ni bila predtretirana, na Cu-Zn SOD pa nima vpliva, medtem ko predtretiranje z askorbinsko kislino povečajo aktivnost Cu-Zn SOD, aktivnost Mn SOD pa se ne spremeni. Vpliv obeh antioksidantov je koncentracijsko odvisen. Pri predtretiranju (4 oz. 24 h) z

antioksidantoma se ni izkazal kot pomemben dejavnik vpliva na aktivnost tako Cu-Zn kot Mn SOD. Rezultati torej kažejo tudi, da se je predtretiranje celic s kvercetinom drugače odrazilo na ravni Cu-Zn SOD in Mn SOD kot predtretiranje z AA. Mn SOD se namreč bolj odziva na kvercetin, Cu-Zn SOD pa bolj na askorbinsko kislino.

8 VIRI

- Alarcón O. M., Vásquez F., Acosta A., Burguera J. L., Burguera M., Ortega S. Y. 1991. Hematologic changes in rats treated with high doses of vitamin K3 (menadione). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 41: 363-374.
- Albano E., Bellomo G., Parola M., Carini R., Dianzani M. U. 1991. Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1091: 310-316.
- Ames B. N., Gold L. S., Willett W. C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 5258-5265.
- Andrus P. K., Fleck T. J., Gurney M. E., Hall E. D. 1998. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 71: 2041-2048.
- Autor A. P. 1982. Biosynthesis of mitochondrial manganese superoxide dismutase in *S. cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 2713-2718.
- Awad H. M., Boersma M. G., Vervoort J., Rietjens I. M. 2000. Peroxidase catalyzed formation of quercetin quinone methide–glutathione adducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378: 224-233.
- Awad H. M., Boersma M. G., Boeren S., van Bladeren P. J., Vervoort J., Rietjens I. M. 2002. The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chemical Research in Toxicology*, 15: 343-351.
- Bacon B. R., O'Neill R., Britton R. S. 1993. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology*, 105: 1134-1140.
- Bakker B. M., Overkamp K. M., Van Maris A. J. A., Kotter P., Luttik M. A. H., Van Dijken J. P., Pronk J. T. 2001. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 15-17.
- Barros A. I. R. N. A., Nunes F. M., Gonçalves B., Bennett R. N., Silva A. P. 2011. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*, 128: 165-172.
- Behl C. 1999. Alzheimer's disease and oxidative stress implications for novel therapeutic approaches. *Progress in Neurobiology*, 57: 301-323.

- Bhattacharyya S., Ghosh J., Sil P. C. 2012. Iron induces hepatocytes death via MAPK activation and mitochondria-dependent apoptotic pathway: beneficial role of glycine. *Free Radical Research*, 46: 1296-1307.
- Boots A. W., Kubben N., Haenen G. R. M. M., Bast A. 2003b. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308: 560-565.
- Bordo D., Djinovic K., Bolognesi M. 1994. Conserved patterns in the Cu-Zn superoxide dismutase family. *Journal of Molecular Biology*, 238: 366-386.
- Bradford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brière J. J., Schlemmer D., Chretien D., Rustin P. 2004. Quinone analogues regulate mitochondrial substrate competitive oxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316: 1138-1142.
- Brihelius-Flohe R. 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 387: 1329-1335.
- Buettner G. R., Jurkiewicz B. A. 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, 145: 532-541.
- Cabiscol E., Piulats E., Echave P., Herrero E., Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 27393-27398.
- Cadenas E. 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6: 391-397.
- Cadenas E., Sies H. 1998. The lag phase. *Free Radical Research*, 28: 601-609.
- Calcutt G. 1951. The formation of hydrogen peroxide during the autoxidation of ascorbic acid. *Experientia*, 7: 26-26.
- Carocho M., Ferreira I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51: 15-25.
- Chen C., Zhou J., Ji C. 2010. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sciences*, 87: 333-338.
- Chung S. H., Chung S. M., Lee J. Y., Kim S. R., Park K. S., Chung J. H. 1999. The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of

- menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. *FEBS Letters*, 23: 235-240.
- Costa V., Amorim M. A., Reis E., Quintanilha A., Moradas-Ferreira P. 1997. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*, 143: 1649-1656.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 4-5: 217-246.
- Culotta V. C., Yang M., O'Halloran T. V. 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 747-758.
- Cushnie T. P., Lamb A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343-356.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9: 169-176.
- Dalle-Donne I., Scaloni A., Giustarini D., Cavarra E., Tell G., Lungarella G., Colombo R., Rossi R., Milzani A. 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 1: 55-99.
- Darmanyan A. P., Gregory D. D., Guo Y., Jenks, W. S. Burel, L., Eloy D., Jardon P. 1998. Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 396-403.
- Das J., Ghosh J., Manna P., Sinha M., Sil P. C. 2009. Arsenic-induced oxidative cerebral disorders: protection by taurine. *Drug and Chemical Toxicology*, 32: 93-102.
- Das J., Ghosh J., Manna P., Sil P. C. 2011. Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. *Biochemical Pharmacology*, 81: 891-909.
- Das J., Roy A., Sil P. C. 2012. Mechanism of the protective action of taurine in toxin and drug induced organ pathophysiology and diabetic complications: a review. *Food and Function*, 3: 1251-1264.
- Das J., Sil P. C. 2012. Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress related signaling pathways and apoptosis in rats. *Amino Acids*, 43: 1509-1523.
- De Grey A. D. N. J. 2002. HO₂•: The forgotten radical. *DNA and Cell Biology*, 21: 251-257.

- De Vries S. 1986. The pathway of electron transfer in the dimeric QH₂: cytochrome c oxidoreductase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18: 195-224.
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32: 1102-1115.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95.
- Duarte T. L., Lunec J. 2005. Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, 39: 671-686.
- Du J., Cullen J. J., Buettner G. R. 2012. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826, 2: 443-457.
- Erlund I., Kosonen T., Alfthan G., Maenpaa J., Perttunen K., Kenraali J., Parantainen J., Aro A. 2000. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56: 545-553.
- Erlund I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 10: 851-874.
- Fariss M. W., Chan C. B., Patel M., van Houten B., Orrenius S. 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions*, 5: 98-114.
- Farrugia G., Balzan R. 2012. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology*, 2: 64, doi: 10.3389/fonc.2012.00064: 21 str.
- Floreani M., Carpenedo F. 1992. One- and two-electron reduction of menadione in guinea-pig and rat cardiac tissue. *General Pharmacology*, 23: 757-762.
- Frankel E. N., Meyer A. S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925-1941.
- Frei B., England L., Ames B. N. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6377-6381.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112.
- Galati G., O'Brien P. J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37: 287-303.

- Gamble P. E., Burke J. J. 1984. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. *Plant Physiology*, 76: 615-621.
- Gralla E. B., Valentine J. S. 1991. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu-Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology*, 173: 5918-5920.
- Gray J. V., Petsko G. A., Johnston G. C., Ringe D., Singer R. A., Werner-Washburne M. 2004. »Sleeping beauty«: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 187-206.
- Gerschman R., Gilbert D. L., Nye S. W., Dwyer P., Fenn W. O. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation - a mechanism in common. *Science*, 119: 623-626.
- Ghosh M., Das J., Sil P. C. 2012. D(+) galactosamine induced oxidative and nitrosative stress-mediated renal damage in rats via NF- κ B and inducible nitric oxide synthase (iNOS) pathways is ameliorated by a polyphenol xanthone, mangiferin. *Free Radical Research*, 46: 116-132.
- Griffiths H. R., Lunec J. 2001. Ascorbic acid in the 21st century - more than a simple antioxidant. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 4: 173-182.
- Grigolava I. V., Ksenzenko M., Konstantinob A. A., Tikhonov A. N., Kerimov T. M. 1980. Tiron as a spin-trap for superoxide radicals produced by the respiratory chain of submitochondrial particles. *Biokhimiia*, 45: 75-82.
- Guidot D. M., McCord J. M., Wright R. M., Repine J. E. 1993. Absence of electron transport (Rho0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 26699-26703.
- Gus'kova R. A., Ivanov I. I., Kol'tover V. K., Akhobadze V. V., Rubin A. B. 1984. Permeability of bilayer lipid membranes for superoxide ($O_2^{\bullet-}$) radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 778: 579-585.
- Guthrie C., Fink G. R. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology*, 194: 1-863.
- Haenen G. R. M. M., Bast A. 1999. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods in Enzymology*, 301: 490-503.
- Halliwell B., Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57: 715-724.

- Halliwell B., Cross C.E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, 10: 5-12.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18: 125-126.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2000. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, Oxford University Press: 851 str.
- Halliwell B. 2008. "Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 2: 107-112.
- Halliwell B. 2010. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32: 125-130.
- Han D., Williams E., Cadenas E. 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochemical Journal*, 353: 411-416.
- Han D., Antunes F., Canali R., Rettori D., Cadenas E. 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 5557-5563.
- Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16: 845-850.
- Harman D. 1956. Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journal of Gerontology*, 11: 298-300.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Herrero E., Ros J., Bellí G., Cabisco E. 2007. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 11: 1217-1235.
- Hiltunen J. K., Mursula A. M., Rottensteiner H., Wierenga R. K., Kastaniotis A. J., Gurvitz A. 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 35-64.

- Hirsch E. C. 1993. Does oxidative stress participate in nerve cell death in Parkinson's disease? *European Neurology*, 33: 52-59.
- Hollman P. C., Katan M. B. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapie*, 51: 305-310.
- Hottinger A. F., Fine E. G., Gurney M. E., Zurn A. D., Aebischer P. 1997. The copper chelator d-penicillamine delays onset of disease and extends survival in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, 9: 1548-1551.
- Ioku K., Tshuida T., Tokei Y., Nakatani I. 1995. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1234: 99-104.
- Ito S., Kato T., Fujita K. 1988. Covalent binding of catechols to proteins through the sulphhydryl group. *Biochemical Pharmacology*, 37: 1707-1710.
- Ivanova I. P., Trofimova S. V., Piskarev I. M. 2013. Evaluation of prooxidant properties of ascorbic acid. *Molecular Biophysics*, 58, 4: 453-456.
- Jones D. P., Carlson J. L., Mody V. C., Cai J. Y., Lynn M. J., Sternberg P. 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 28: 625-635.
- Jorgensen L. V., Cornett C., Justesen U., Skibsted L. H., Dragsted L. O. 1998. Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free Radical Research*, 29: 339-350.
- Kalyanaraman B., Premovic P. I., Sealy R. C. 1987. Semiquinone anion radicals from addition of amino acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines. An ESR spin stabilization study. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 11080-11087.
- Kancheva V. D. 2009. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chainbreaking activity: a comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111: 1072-1089.
- Khare S. D., Caplow M., Dokholyan N. V. 2004. The rate and equilibrium constants for a multistep reaction sequence for the aggregation of superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 15094-15099.
- Kim I. S., Yun H., Iwahashic H., Jin I. 2006. Genome-wide expression analyses of adaptive response against medadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*, 41,11: 2305-2313.

- Kim I. S., Sohn H. Y., Jin I. 2011. Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Journal of Microbiology*, 49, 5: 816-823.
- Kovacic P., Jacintho J. D. 2001. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 773-796.
- Krasowska A., Dziadkowiec D., Lukaszewicz M., Wojtowicz K., Sigler K. 2003. Effect of antioxidants on *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in superoxide dismutases. *Folia Microbiologica*, 48, 6: 754-760.
- Krishnendu S., Joydeep D., Pabitra B. P., Parames C. S. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 87, 7: 1157-1180.
- Kuhnau J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24: 117-191.
- Kurtz D. M. 2004. Microbial detoxification of superoxide: the non-heme iron reductive paradigm for combating oxidative stress. *Accounts of Chemical Research*, 37: 902-908.
- Linster C.L., Van Schaftingen E. 2007. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*, 274: 1-22.
- Liu X., Elashvili I., Gralla E. B., Valentine J., Lapinskas P., Culotta V. 1992. Yeast lacking superoxide dismutase: isolation of genetic suppressors. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 18298-18302.
- Liu Y., Fiskum G., Schubert D. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80: 780-787.
- Longo V. D., Gralla E. B, Valentine J. S. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 12275-12280.
- Luk E., Yang M., Jensen L. T., Bourbonnais Y., Culotta V. C. 2005. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 22715-22720.
- Lushchak V., Semchyshyn H., Mandryk S., Lushchak O. 2005. Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441, 1: 35-40.
- Lü J., Lin P. H., Yao Q., Chen C. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14: 840-860.

- Madesh M., Hajnoczky G. 2001. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *Journal of Cell Biology*, 155: 1003-1015.
- Marres C. A. M., De Vries S., Grivell L. A. 1991. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 195: 857-862.
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 577-586.
- McCord J. M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055.
- Mendoza-Wilson A. M., Glossman-Mitnik D. 2004. CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 681: 71-76.
- Metodiewa D., Jaiswal A. K., Cenas N., Dickancaite E., Segura Aguilar J. 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 107-116.
- Min D. B., Boff J. M. 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 1: 58-72.
- Monks T.J., Hanzlik R.P., Cohen G.M., Ross D., Graham D.G. 1992. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 112: 2-16.
- Monks T. J., Jones D. C. 2002. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Current Drug Metabolism*, 3: 425-438.
- Monteiro J.P., Martins A. F., Nunes C., Morais C. M., Lúcio M., Reis S., Pinheiro T. J., Geraldes C. F., Oliveira P. J., Jurado A. S. 2013. A biophysical approach to menadione membrane interactions: relevance for menadione-induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 8: 1899-1908.
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19, 4: 651-658.
- Moradas-Ferreira P., Costa V. 2000. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*, 5, 5: 277-285.

- Movileanu L., Neagoe I., Flonta M. L. 2000. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 205: 135-146.
- Muller F. L., Liu Y., Van Remmen H. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 49064-49073.
- Müller B., Grossniklaus U. 2010. Model organisms-A historical perspective. *Journal of Proteomics*, 73, 11: 2054-2063.
- Nogueira C. W., Zeni G., Rocha, J. B. T. 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews*, 104: 6255-6285.
- Nohl H., Kozlov A. V., Gille L., Staniek K. 2003. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochemical Society Transactions*, 31: 1308-1311.
- Nutter L. M., Ann-Lii C., Hsiao-Ling H., Ruey-Kun H., Ngo E. O., Tsang-Wu L. 1991. Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 41: 1283-1292.
- Ohnishi T. 1973. Mechanism of electron transport and energy conservation in the site I region of the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 301: 105-128.
- Orr W. C., Sohal R. S. 1994. Extension of life-span by over expression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263: 1128-1130.
- Orrenius S. 1985. Biochemical mechanisms of cytotoxicity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 6: 15-20.
- Overkamp K. M., Bakker B. M., Kötter P., Van Tuijl A, De Vries S., Van Dijken J. P., Pronk J. T. 2000. *In vivo* analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Journal of Bacteriology*, 182: 2823-2830.
- Pal S., Pal P. B., Das J., Sil P. C. 2011. Involvement of both intrinsic and extrinsic pathways in hepatoprotection of arjunolic acid against cadmium induced acute damage *in vitro*. *Toxicology*, 283: 129-139.
- Pal P. B., Pal S., Das J., Sil P. C. 2012. Modulation of mercury-induced mitochondria-dependent apoptosis by glycine in hepatocytes. *Amino Acids*, 42: 1669-1683.
- Pastor N., Weinstein H., Jamison E., Brenowitz M. 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. *Journal of Molecular Biology*, 304: 55-68.

- Penning T. M., Burczynski M. E., Hung C. F., McCoull K. D., Palackal N. T., Tsuruda L. S. 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chemical Research in Toxicology*, 12: 1-18.
- Podmore I. D., Griffiths H. R., Herbert K. E., Mistry N., Mistry P., Lunec J. 1998. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 392: 559-559.
- Pokorny J. 2007. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 629-642.
- Procházková, D., I. Boušová and N. Wilhelmová. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 4: 513-523.
- Puglia C. D., Powell S. R. 1984. Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environmental Health Perspectives*, 57: 307-311.
- Raha S., Robinson B. H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*. 25: 502-508.
- Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2: 219-236.
- Rashid K., Bhattacharya S., Sil P. C. 2012. Protective role of D-saccharic acid-1,4-lactone in alloxan induced oxidative stress in the spleen tissue of diabetic rats is mediated by suppressing mitochondria dependent apoptotic pathway. *Free Radical Research*, 46: 240-252.
- Ratnam D. V., Ankola D. D., Bhardwaj V., Sahana D. K., Kumar N. M. V. R. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113: 189-207.
- Rehman A., Collis C. S., Yang M., Kelly M., Diplock A. T., Halliwell B., Rice-Evans C. 1998. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246: 293-298.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-956.
- Rich P. R., Bonner W. D. 1978. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 188: 206-213.
- Rose R. C. 1988. Transport of vitamin C and other water soluble vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 947: 335-366.

- Sakagami H., Satoh K., Hakeda Y., Kumegawa M. 2000. Apoptosis inducing activity of vitamin C and vitamin K. *Cellular and Molecular Biology*, 46: 129-143.
- Sarkar M. K., Sil P. C. 2010. Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb, *Phyllanthus niruri*. *Toxicology in vitro*, 24: 1711-1719.
- Stevenson D. E., Hurst R. D. 2007. Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 22: 2900-2916.
- Shen D., Dalton T. P., Nebert D. W., Shertzer H. G. 2005. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 25305-25312.
- Siems W. G., Grune T., Esterbauer H. 1995. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Sciences*, 57: 785-789.
- Stadtman E. R. 2004. Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1105-1112.
- Sturtz L.A., Diekert K., Jensen L. T., Lill R., Culotta V. C. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria: a physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 38084-38089.
- Suberlich H. A. 1994. Pharmacology of vitamin C. *Annual Review of Nutrition*, 14: 371-391.
- Tsukaguchi H., Tokui T., Mackenzie B., Berger U. V., Chen X.Z., Wang Y.X., Bubaker R. F., Hediger M. A. 1999. A family of mammalian sodium dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399: 70-75.
- Turrens J. F., Boveris A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 191: 421-427.
- Turrens J. F., Alexandre A., Lehninger A. L. 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237: 408-414.
- Turrens J. F. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 17: 3-8.
- Tzeng W. F., Chiou T. J., Huang J. Y., Chen Y. H. 1992. Menadione-induced cardiotoxicity is associated with alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences*, 16: 84-90.

- Valko M., Morris H., Mazur M., Raptá P., Bilton R. F. 2001. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527: 161-166.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266: 37-56.
- Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1161-1208.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 1: 44-84.
- Van Loon A. P., Pesold-Hurt B., Schatz G. 1986. A yeast mutant lacking mitochondria manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 3820-3824.
- Van Acker S. A., Tromp M. N., Haenen G. R. M. M., van der Vijgh W.J., Bast A. 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214: 755-759.
- Varadharaj S., Watkins T., Cardounel A. J., Garcia J. G., Zweier J. L., Kuppusamy P., Natarajan V., Parinandi N. L. 2005. Vitamin C-induced loss of redox-dependent viability in lung microvascular endothelial cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7, 1-2: 287-300.
- Villanueva C., Kross R. D. 2012. Antioxidant-induced stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 2091-2109.
- Wintjens R., Noel C., May A. C., Gerbod D., Dufernez F., Capron M., Viscogliosi E., Rooman M. 2004. Specificity and phenetic relationships of iron and manganese-containing superoxide dismutases on the basis of structure and sequence comparisons. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 9248-9254.
- Wójtowicz K., Pawlikowska-Pawłaga B., Gawron A., Misiak L. E., Gruszecki W. I. 1996. Modifying effect of quercetin on the lipid membrane. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 34: 48-50.
- Walker G. M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester, John Wiley and Sons: 350 str.

Yang J. Y., Della-Fera M. A., Rayalam S., Ambati S., Hartzell D. L., Park H. J., Baile C. A. 2008. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sciences*, 82, 19-20: 1032-1039.

Zakrajšek T., Raspor P., Jamnik P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism-characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*, 74, 12: 2837-2845.

Zakrajšek T. 2014. Vpliv eksogenih antioksidantov na endogeni antioksidativni obrambni sistem pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 160 str.

ZAHVALA

Največja zahvala gre enkratni in zelo predani mentorici izr. prof. dr. Poloni Jamnik. Hvala za strokovno vodenje, nasvete, vso podporo in pomoč. Za skupne preglede naloge in lepe pogovore ob tem, ki so bili sproščeni, celo prijateljski. Brez Vaše skrbnosti in požrtvovalnosti naloga ne bi bila to kar je! Dali ste mi veliko več, kot lahko mentor nudi svojemu diplomantu, zato Vas bom vedno ohranila v spominu kot najboljšo mentorico! Proteomski laboratorij pa bo ostal moj prvi »dom« praktičnega usposabljanja, kjer sem res neizmerno uživala ob delu in se ob tem počutila samostojno.

Hvala tudi recenzentu izr. prof. dr. Blažu Cigi za strokovni pregled naloge in koristne nasvete. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Branki Javornik za sodelovanje v komisiji.

Zahvaljujem se tudi Lini Burkan Makivi za tehnični pregled naloge in ureditev literature. Hvala tudi Katji v kopirnici za tehnično urejanje ter tiskanje.

Zahvaljujem se Katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, ki mi je omogočila izvedbo praktičnega dela naloge.

Hvala prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov.

Da ne pozabim še na dr. Tejo Zakrajšek, najboljšo prijateljico, ki je to postala prav na račun tega magistrskega dela. Sprva moja »stroga« delovna mentorica, ki sem se je na račun etike priznam, kar malo bala, kasneje pa moja tesna sodelovka in zaupnica. Draga Teja, hvala ti za vse lepe skupne ure v laboratoriju, tudi pozno v noč; za vse nasvete in strokovno vodenje ter lektorski pregled naloge. Še bolj pa sem ti hvaležna, ker si mi stala ob strani, ko mi je bilo najhuje in sem že skoraj obupala. A si me znala s svojo iskrenostjo vedno spraviti na realna tla in obenem potolažiti. Bejbo, ostani to kar si! Najboljša si ;)

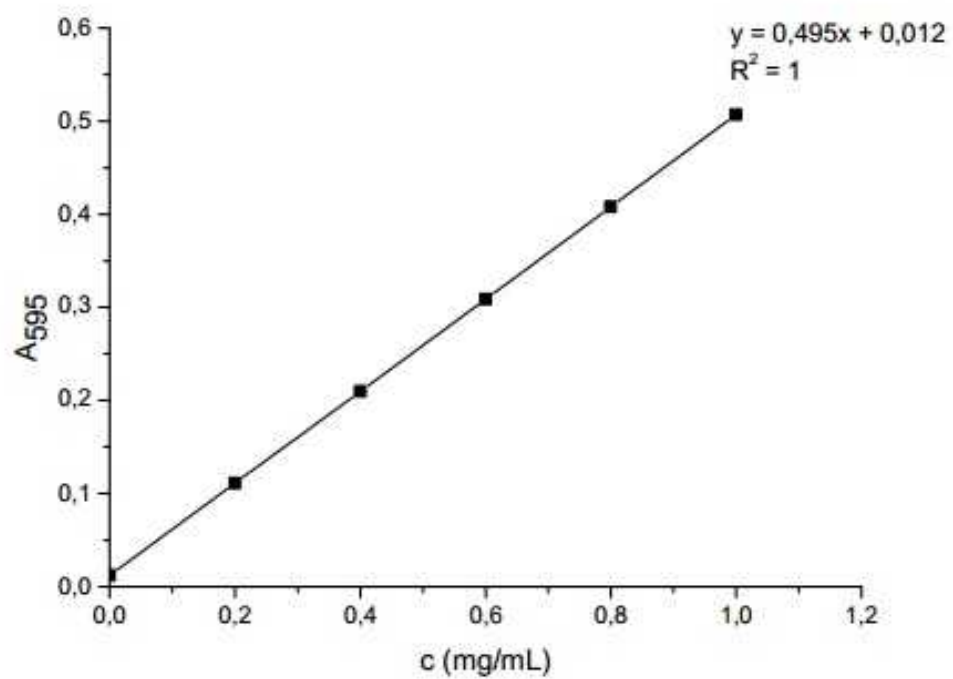
Hvala Niki za dobro družbo v laboratoriju in sodelovanje. Najlepša hvala Saši za tehnični pregled in pomoč! Tudi ostalim prijateljicam (Kristini, Petri, Nuši, Barbari,...) hvala, ker so mi stale ob strani, spodbujale, pomagale ter zaupale in za prijetna druženja.

Tudi gospe Ljerki Poredoš hvala za vsa lepa študentska leta, ki sva jih preživelii skupaj, ko sem stanovala pri Vas. Hvala! Bili ste mi kot druga mati!

Na koncu pa še zahvala najpomembnejšim, mojim ljubim staršem. Hvala vama, ker sta mi omogočila študij, mi stala ob strani, spodbujala, me tolažila in vedno zaupala vame, celo bolj kot jaz sama. Še najbolj sem vaju potrebovala, ko se je začelo pisanje in so bili trenutki še toliko bolj težki, ker nas je ravno takrat prizadela nenadomestljiva izguba naše ljube stare mame. S skupnimi močmi smo prišli do konca. Hvala Vama!

Hvala tudi ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali in so ostali neimenovani.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov

Priloga B: Preglednica z absolutnimi vrednostmi specifične aktivnosti Mn SOD

	4 h	24 h
K	1,48	1,67
K	1,85	1,84
K	1,48	1,53
M	1,81	2,02
M	2,53	2,26
M	2,37	2,63
M	1,73	1,75
M	1,24	1,9
Q1M	2,23	2,43
Q1M	2,37	2,61
Q2M	3,35	2,68
Q2M	2,44	2,38
AA1M	2,23	2,25
AA1M	2,31	1,79
AA2M	1,22	1,26
AA2M	2,91	1,38
AA2M	1,03	/

Priloga C: Preglednica z absolutnimi vrednostmi specifične aktivnosti Cu-Zn SOD

	4 h	24 h
K	1,41	2,25
K	1,21	2,10
K	1,88	2,06
K	1,56	2,51
M	1,32	1,42
M	1,59	1,41
M	1,84	3,57
M	1,47	2,21
M	1,95	1,94
Q1M	1,14	1,45
Q1M	1,25	1,32
Q2M	2,64	2,48
Q2M	3,21	3,07
AA1M	3,01	2,87
AA1M	2,31	2,24
AA2M	1,88	3,31
AA2M	1,73	4,29

Legenda: K-kontrola, M-menadion, Q1M-kvercetin prva koncentracija (0,05 g/L) in menadion, Q2M-kvercetin druga koncentracija (0,117 g/L) in menadion, AA1M-askorbinska kislina prva koncentracija (20 mM) in menadion, AA2M-askorbinska kislina druga koncentracija (40 mM) in menadion.