

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja CIGUT

***IN VIVO ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST
ETANOLNIH IZVLEČKOV PROPOLISA***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja CIGUT

***IN VIVO ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST
ETANOLNIH IZVLEČKOV PROPOLISA***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

***IN VIVO ANTIOXIDANT EFFICIENCY OF
ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Polono Jamnik, za somentorja dr. Tomaža Polaka in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Somentor: dr. Tomaž Polak

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Tomaž Polak
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Blaž Cigić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 10.9.2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Cigut

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 577.112:547.56:638.135(043)=163.6
KG	propolis/izvlečki propolisa/fenolne spojine/kavna kislina/ <i>p</i> -kumarna kislina/ferulna kislina/fenetilni ester kavne kisline/ <i>in vivo</i> /antioksidativna učinkovitost/kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /proteom/proteinski profil/dvodimenzionalna gelska elektroforeza/izoelektrično fokusiranje/SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza
AV	CIGUT, Tanja
SA	JAMNIK, Polona (mentorica)/POLAK, Tomaž (somentor)/ CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	<i>IN VIVO</i> ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST ETANOLNIH IZVLEČKOV PROPOLISA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 73 str., 26 pregl., 20 sl., 7 pril., 61 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru diplomskega dela smo preverili <i>in vivo</i> antioksidativno učinkovitost 96 % etanolnega izvlečka propolisa (96 % EIP) slovenskega porekla. Kot modelni organizem smo uporabili kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 2155 v stacionarni fazni rasti, ki smo jo inkubirali v PBS pufru pri 28 °C in 220 obr./min. EIP smo dodali suspenziji kvasovk v naslednjih koncentracijah fenolnih spojin: 0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 in 0,2 g/L. Po 1-urni izpostavitvi smo izmerili znotrajcelično oksidacijo z uporabo barvila 2'-7'-diklorofluorescein diacetat. Izkazalo se je, da znotrajcelična oksidacija pada z naraščanjem koncentracije fenolnih spojin, in sicer do 0,05 g/L. Dodatno smo preverili <i>in vivo</i> antioksidativno učinkovitost posameznih fenolnih spojin (ferulna kislina, kavna kislina, <i>p</i> -kumarna kislina in fenetilni ester kavne kisline) in kombinacije kislin. Rahlo antioksidativno učinkovitost smo izmerili le v primeru kavne kisline, v ostalih primerih se znotrajcelična oksidacija v primerjavi s kontrolo ni znižala. Z uporabo LC-MS smo preverili tudi celični privzem posameznih fenolnih spojin in EIP. Ugotovili smo, da le CAPE vstopa na/v celico, medtem ko pri ostalih testiranih fenolnih spojinah do privzema ni prišlo. V primeru privzema EIP smo opazili, da v celico vstopi le del, ki vsebuje bolj nepolarne spojine (frakcija F2). Tako smo v nadaljevanju preverili <i>in vivo</i> antioksidativno učinkovitost frakcije F2, ki je v skladu s pričakovanji znižala znotrajcelično oksidacijo. Poleg celične ravni smo vpliv EIP proučili tudi na ravni proteoma. Z dvodimenzionalno elektroforezo smo analizirali proteinski profil celičnega ekstrakta (totalni proteom) in mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta (mitohondrijski proteom) kvasovke po 1-urni izpostavitvi EIP. Vpliv EIP se je na totalnem proteomu odražal minimalno, medtem ko smo na ravni mitohondrijskega proteoma opazili bolj izrazite spremembe, in sicer v okviru antioksidativnih proteinov in proteinov vključenih v sintezo ATP.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.112:547.56:638.135(043)=163.6
CX propolis/extracts of propolis/phenolic compounds/caffeic acid/*p*-coumaric acid/ferulic acid/caffeic acid phenethyl ester/CAPE/*in vivo*/antioxidant efficiency/yeasts/ *Saccharomyces cerevisiae*/proteome/protein profile/two-dimensional gel electrophoresis/isoelectric focusing/SDS polyacrylamide gel electrophoresis
AU CIGUT, Tanja
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/
CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2010
TI *IN VIVO* ANTIOXIDANT EFFICIENCY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 73 p., 26 tab., 20 fig., 7 ann., 61 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the context of the graduation work, *in vivo* antioxidant efficiency of 96 % ethanolic extract of propolis (96 % EEP) of Slovenian origin was determined. As a model organism, we used a yeast *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 in a stationary growth phase, which was incubated in PBS buffer at 28 °C in 220 rpm. EEP was added into a yeast suspension in the following concentrations of phenolic compounds: 0; 0.0125; 0.025; 0.05; 0.1 and 0.2 g/L. After 1-hour exposure we measured intracellular oxidation using a dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. It was found that intracellular oxidation decreases with increasing concentration of phenolic compounds, up to 0.05 g/L. Additionally we determined *in vivo* antioxidant efficiency of individual phenolic compounds (ferulic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid and caffeic acid phenethyl ester) and a combination of acids. Slight antioxidant efficiency was observed for caffeic acid, in other cases, the intracellular oxidation compared with the control did not decrease. By using LC-MS, cellular uptake of individual phenolic compounds and EEP was checked. Uptake into/on cell was found only for CAPE, while other tested phenolic compounds did not enter the cells. In the case of EEP only a fraction including more non-polar phenolic compounds entered the cells (fraction F2). We than determined *in vivo* antioxidant efficiency of fraction F2, which as expected, decreased intracellular oxidation. Beside to cellular level, we also examined the influence of EEP on the proteome level. With two-dimensional electrophoresis, we analyzed the protein profile of cell extract (total proteom) and mitochondrial fraction of cell extract (mitochondrial proteom) of yeast, after 1-hour exposure to the EEP. The influence of EEP on total proteom was minimal, while more apparent changes in protein abundance was found on mitochondrial proteom, including antioxidative proteins and proteins included in ATP synthesis.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OKSIDATIVNI STRES	3
2.2 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI (ROS)	3
2.2.1 Izvori ROS.....	3
2.2.2 Glavne vrste ROS	5
2.2.3 Delovanje ROS	6
2.3 OKSIDATIVNI STRES IN PROTEOM	7
2.4 ENDOGENI ANTIOKSIDANTIVNI OBRAZBNI SISTEM	8
2.4.1 Vrste antioksidantov	8
2.4.2 Endogeni antioksidativni obrambni sistem kvasovke <i>S. cerevisiae</i>.....	8
2.5 EKSOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAZBNI SISTEM	10
2.5.1 Propolis	10
2.5.1.1 Vir in sestava propolisa	10
2.5.1.2 Uporaba propolisa	11
2.5.1.3 Antioksidativna učinkovitost propolisa <i>in vitro</i>	12
2.5.1.4 Antioksidativna učinkovitost propolisa <i>in vivo</i>	13
2.6 FENOLNE SPOJINE	13
2.6.1 Fenolne spojine v propolisu	14
2.6.1.1 Hidroksicimetne kisline	15
2.6.1.2 Flavonoidi	17
2.7 KVASOVKA <i>S. CEREVISIAE</i> V STACIONARNI FAZI RASTI KOT MODELNI ORGANIZEM	17
2.7.1 Prednosti kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	18
2.7.2 Stacionarna faza kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 POTEK DELA.....	19
3.2 MATERIALI	20
3.2.1 Propolis	20

3.2.2	Standardne fenolne spojine	20
3.2.3	Dimetil sulfoksid (DMSO)	20
3.2.4	Mikroorganizem	20
3.2.5	Gojišča	21
3.2.6	Raztopine in reagenti	22
3.2.6.1	Inkubacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	22
3.2.6.2	Preverjanje <i>in vivo</i> antioksidativne učinkovitosti EIP in posameznih fenolnih spojin	22
3.2.6.3	Preverjanje celičnega privzema posameznih fenolnih spojin in EIP z LC-MS...	23
3.2.6.4	Ekstrakcija na trdni fazni (SPE)	23
3.2.6.5	Ekstrakcija totalnih proteinov.....	23
3.2.6.6	Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov	24
3.2.6.7	Merjenje koncentracije proteinov	24
3.2.6.8	1. dimenzija	24
3.2.6.9	2. dimenzija	25
3.2.6.10	Barvanje gelov	26
3.2.7	Aparature in naprave.....	28
3.3	METODE	30
3.3.1	Priprava založne raztopine EIP	30
3.3.2	Priprava založnih raztopin posameznih standardnih fenolnih spojin.....	30
3.3.3	Ekstrakcija na trdni fazni (SPE)	30
3.3.4	Kultivacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i> in izpostavitev EIP in posameznim fenolnim spojinam	31
3.3.5	Preverjanje <i>in vivo</i> antioksidativne učinkovitosti EIP in posameznih fenolnih spojin z merjenjem znotrajcelične oksidacije	31
3.3.6	Preverjanje celičnega privzema EIP in posameznih fenolnih spojin z LC-MS	32
3.3.7	Ekstrakcija totalnih proteinov	34
3.3.8	Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov	34
3.3.9	Merjenje koncentracije proteinov v ekstraktih	34
3.3.10	2-DE	35
3.3.10.1	1. dimenzija	35
3.3.10.2	2. dimenzija	37
3.3.11	Barvanje gelov	39
3.3.12	Slikanje gelov	39
3.3.13	Analiza slike	40
3.3.14	Statistična analiza rezultatov.....	41
3.3.14.1	Statistična analiza antioksidativne učinkovitosti	41
3.3.14.2	Statistična analiza spremembe proteoma.....	42
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	43
4.1	PREVERJANJE <i>IN VIVO</i> ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI EIP IN POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN	43
4.1.1	Preverjanje <i>in vivo</i> antioksidativne učinkovitosti EIP	43

4.1.2	Preverjanje <i>in vivo</i> antioksidativne učinkovitosti posameznih fenolnih spojin.....	48
4.2	PREVERJANJE CELIČNEGA PRIVZEMA POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN IN EIP Z LC-MS	51
4.2.1	Preverjanje celičnega privzema posameznih fenolnih spojin z LC-MS	51
4.2.2	Preverjanje celičnega privzema EIP z LC-MS	55
4.3	DOLOČANJE <i>IN VIVO</i> ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI DVEH FRAKCIJ EIP	57
4.4	PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV CELIC KVASOVK <i>S. CEREVISIAE</i> PRED IN PO IZPOSTAVITVI EIP IN F2	59
4.4.1	Vpliv EIP na raven totalnih proteinov	59
4.4.2	Vpliv EIP in frakcije F2 na raven mitohondrijskih proteinov.....	60
5	SKLEPI	66
6	POVZETEK.....	67
7	VIRI	69

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Primarni in sekundarni endogeni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).....	9
Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000)	14
Preglednica 3: Fenolne spojine etanolnega izvlečka propolisa (96 % EIP) slovenskega porekla, ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008, določene z LC-MS (Mavri in sod., 2010)	15
Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča (Atlas in Lawrence, 1993).....	21
Preglednica 5: Sestava tekočega gojišča (Atlas in Lawrence, 1993)	21
Preglednica 6: Sestava PBS pufra	22
Preglednica 7: Sestava 50 mM K ₂ HPO ₄	22
Preglednica 8: Sestava 50 mM KH ₂ PO ₄	22
Preglednica 9: Sestava 1 mM založne raztopine H ₂ DCFDA	23
Preglednica 10: Sestava ekstrakcijskega pufra (PE).....	23
Preglednica 11: Sestava rehidracijskega pufra (RP).....	24
Preglednica 12: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida.....	25
Preglednica 13: Sestava osnovnega pufra za uravnovešenje	25
Preglednica 14: Sestava agarozne raztopine.....	26
Preglednica 15: Sestava 1x SDS elektroforeznega pufra	26
Preglednica 16: Sestava fiksacijske raztopine	26
Preglednica 17: Sestava raztopine za razbarvanje	27
Preglednica 18: Gradient mobilne faze A (1 % raztopina metanojske kisline).....	33
Preglednica 19: Postopek barvanja gelov.....	39

Preglednica 20: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP)	44
Preglednica 21: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam dimetil sulfoksida (DMSO).....	46
Preglednica 22: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi posameznih fenolnih spojin in kombinacije fenolnih spojin v koncentraciji 0,05 g/L.	49
Preglednica 23: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi frakciji F1 in F2	57
Preglednica 24: Prikaz ravni totalnih proteinov pri vzorcih kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L glede na kontrolo	60
Preglednica 25: Prikaz ravni mitohondrijskih proteinov pri vzorcih kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po izpostavitvi EIP v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L glede na kontrolo	62
Preglednica 26: Prikaz ravni mitohondrijskih proteinov pri vzorcih kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po izpostavitvi frakciji F2 glede na kontrolo	64

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Mesta nastanka superoksidnega aniona in vodikovega peroksida v mitohondrijski dihalni verigi (Turrens, 2003)	4
Slika 2: Osnovna struktura formula kavne kisline, <i>p</i> -kumarne kisline in ferulne kisline (NCBI, 2010a).....	16
Slika 3: Osnovna struktura formula CAPE (Kumazawa in sod., 2004)	16
Slika 4: Osnovna struktura formula flavonoidov (Abram, 2000).....	17
Slika 5: Shematski prikaz poteka dela.....	19
Slika 6: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu.....	35
Slika 7: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2-D Dymension	40
Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP), izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI).....	45
Slika 9: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam dimetil sulfoksida (DMSO), izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI).....	47
Slika 10: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi posameznim fenolnim spojinam in kombinaciji fenolnih spojin v koncentraciji 0,05 g/L glede na kontrolo, izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI).	50
Slika 11: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi kavni kislini v koncentraciji 0,05 g/L	51
Slika 12: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi <i>p</i> -kumarni kislini v koncentraciji 0,05 g/L	52
Slika 13: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi ferulni kislini v koncentraciji 0,05 g/L	53

Slika 14: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi CAPE v koncentraciji 0,05 g/L ..	54
Slika 15: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP)	55
Slika 16: S SPE ločene fenolne spojine etanolnega izvlečka propolisa (EIP) v dve frakciji glede na polarnost, A - bolj polarna frakcija (F1, retencijski čas < 30 min) in B - bolj nepolarna frakcija (F2, retencijski čas > 30 min).....	56
Slika 17: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 1-urni izpostavitvi frakciji F1 in F2 glede na kontrolo, izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI)	58
Slika 18: Proteinski profil celičnega ekstrakta kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A - kontrola, B - 1-urna izpostavitev etanolnemu izvlečku propolisa v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L).....	59
Slika 19: Proteinski profil mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A - kontrola, B - 1-urna izpostavitev etanolnemu izvlečku propolisa v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L)	61
Slika 20: Proteinski profil mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A - kontrola, B - 1-urna izpostavitev frakciji F2).....	63

KAZALO PRILOG

Priloga A: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP) v koncentraciji 0,05, 0,1 in 0,2 g/L glede na kontrolo

Priloga B: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP) v koncentraciji 0,0125, 0,025 in 0,05 g/L glede na kontrolo

Priloga C: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam dimetil sulfoksida (DMSO)

Priloga D: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi posameznih fenolnih spojin in kombinacije fenolnih spojin v koncentraciji 0,05 g/L glede na kontrolo

Priloga E: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi frakciji F1 in F2 glede na kontrolo

Priloga F: Proteinska mapa (totalni proteini) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* predhodno izdelana v Laboratoriju za proteomiko

Priloga G: Proteinska mapa (mitohondrijski proteini) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* predhodno izdelana v Laboratoriju za proteomiko

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₅₉₅	absorbanca ($\lambda=595$)
APS	amonijev persulfat
Atp1	α podenota F1 dela F0F1 ATPaze
BFM	bromfenol modro
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
c	konzentracija
Ca ²⁺	kalcijev kation
CAPE	fenetilni ester kavne kisline (ang. caffeic acid phenethyl ester)
CHAPS	3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propan-sulfonat (ang. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate)
CP	citosolni ekstrakcijski pufer
Cu	baker
Cu/Zn SOD	baker in cink vsebujoča superoksid dismutaza
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DCF	diklorofluorescein (ang. diclorofluorescein)
DMAC	1,1-dimetilalilkafetat (ang. 1,1-dimethylallylcaffeate)
DMSO	dimetil sulfoksid (ang. dimethyl sulfoxide)
DPPH [·]	1,1-difenetil-2-pikrilhidrazil (ang. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
DTT	ditiotreitol
EIP _{DMSO}	suh preostanek 96 % EIP raztopljen v DMSO
ESI	elektrosprej ionizacija
ESI [·]	ESI v negativnem načinu
FI	fluorescenčna intenziteta
F1	frakcija EIP _{DMSO} , ki je bila eluirana s kolone Strata-X s 30 % metanolom
F2	frakcija EIP _{DMSO} , ki je bila eluirana s kolone Strata-X s 100 % metanolom
g	gravitacijski pospešek (m/s ²)
H ₂ DCF	2',7'-diklorodihidrofluorescein (ang. 2',7'-diclorodihydrofluorescein)
H ₂ DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (ang. 2',7'-diclorodihydrofluorescein diacetate)
Hsp	proteini vročinskega šoka (ang. Heat Shock Proteins)
IEF	izoelektrično fokusiranje
IP	inhibitor proteaz
IPG	imobiliziran pH gradient
JAA	jodacetamid
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogenfosfat
kDa	kilodalton
LC-MS	tekočinska kromatografija, sklopljena z masnim spektrometrom (ang. liquid chromatography-mass spectrometry)

Mn SOD	mangan vsebujoča superoksid dismutaza
MP	mitohondrijski ekstrakcijski pufer
MW	molekulska masa (ang. molecular weight) (Da)
NaCl	natrijev klorid
Na ₂ HPO ₄	dinatrijev hidrogenfosfat
obr./min	obrati na minuto
OD ₆₅₀	optična gostota pri 650 nm
PBS	pufer (NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄)
PE	ekstrakcijski pufer
pI	izoelektrična točka
Prx1	peroksiredoksin
Qcr2	podenota 2 ubikinol c reduktaze
RFI	relativna fluorescenčna intenziteta
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
RP	rehidracijski pufer
SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulfate)
SDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (ang. sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis)
SEM	standardna napaka (ang. standard error of the mean)
SPE	ekstrakcija na trdni fazi
TEMED	tetrametiletilendiamin (ang. tetramethylene diamine)
Ti	titan
Tris HCl	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol, vodikov klorid (ang. 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol, hydrogen chloride)
v/v	mL/100 mL
VIP	vodni izvlečki propolisa
w/v	g/100 mL
YEFD	gojišče (kvazni ekstrakt, pepton, glukoza)
ZIM	zbirka industrijskih mikrorganizmov
2-DE	dvodimenzionalna elektroforeza
96 % EIP	propolis ekstrahiran z zmesjo etanol/voda (96 : 4 v/v)

1 UVOD

Oksidativni stres definiramo kot porušeno ravnotežje med reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) in antioksidanti v celici, v prid ROS. Oksidativne poškodbe, ki jih v celici povzročajo ROS, v normalnih fizioloških pogojih preprečijo endogeni antioksidativni obrambni sistemi. Delujejo namreč tako, da nevtralizirajo ROS in popravljajo že nastale poškodbe (Sies, 1997). Vendar so v določenih primerih endogeni antioksidativni obrambni sistemi nezadostni, da bi popolnoma preprečili poškodbe, zato je pomemben vnos antioksidantov iz živil in prehranskih dopolnil. Zadnja leta narašča predvsem zanimanje o vlogi rastlinskih fenolnih spojin, še posebej flavonoidov (Halliwell, 1996).

Kvasne celice so z vidika osnovnih celičnih in metabolnih procesov podobne celicam sesalcev. Potemtakem ni presenečenje, da kvasno celico uporabljamo kot modelni organizem za proučevanje molekularnih mehanizmov celične obrambe pred oksidativnim stresom (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Številne raziskave so pokazale antioksidativno učinkovitost propolisa *in vitro* (Kumazawa in sod., 2004; Gregoris in Stevanto, 2010; Isla in sod., 2001; Silva in sod., 2006). Predvideva se, da je ta lastnost posledica fenolnih spojin, ki jih propolis vsebuje (Kumazawa in sod., 2004; Gregoris in Stevanto, 2010; Ahn in sod., 2004; Ahn in sod., 2007) in so znani antioksidanti *in vitro* (Rice-Evans in sod., 1997). Vendar so potrebne nadaljnje raziskave, da bi potrdili to odvisnost.

Antioksidanti imajo lahko zelo izrazito antioksidativno učinkovitost, vendar ni nujno, da molekule, ki so aktivne pri *in vitro* poskusih, delujejo tudi v organizmu. Za ovrednotenje je potrebno upoštevati tudi kinetiko ustreznih snovi v organizmu, kar pa je pri kompleksnih in raznolikih snoveh rastlinskega izvora še razmeroma malo raziskano. V zadnjem času so raziskave molekulskih in genetskih interakcij fitokemikalij in drugih bioaktivnih snovi hrane razmeroma intenzivne (Kreft in sod., 2000). Pojavilo se je kar nekaj študij, v katerih so preučevali *in vivo* antioksidativno učinkovitost propolisa na glodavcih (Sun in sod., 2000; Padmavathi in sod., 2006; Kanbur in sod., 2009) in na ljudeh (Jasprica in sod., 2007). Nobena od navedenih študij ni iskala povezave med *in vivo* antioksidativno učinkovitostjo propolisa in fenolnimi spojinami, zato sem se v tej diplomski nalogi posvetila temu problemu.

1.2 CILJI NALOGE

- preveriti antioksidativno učinkovitost izvlečkov propolisa v kvasni celici in jo primerjati z antioksidativno učinkovitostjo posameznih fenolnih spojin,
- preveriti privzem izvlečka propolisa in posameznih fenolnih spojin v kvasno celico,
- preveriti vpliv izvlečka propolisa na izražanje citosolnih in mitohondrijskih proteinov kvasne celice.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da:

- bo izvleček propolisa pokazal antioksidativno učinkovitost *in vivo* in bo ta lastnost naraščala s koncentracijo fenolnih spojin,
- bodo posamezne fenolne spojine pokazale manjšo antioksidativno učinkovitost *in vivo* kot celoten izvleček propolisa,
- bo antioksidativna učinkovitost izvlečka propolisa *in vivo* rezultat delovanja le nekaterih fenolnih spojin,
- se bo prisotnost propolisa kot eksogenega antioksidanta odražala na proteomu modelnega organizma.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je porušeno ravnotežje med reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) in antioksidanti v celici, v prid ROS (Sies, 1997). V normalnih fizioloških pogojih so endogeni antioksidativni obrambni sistemi zadostni, da vzdržujejo ROS v nenevarni koncentraciji in popravljajo celične poškodbe. Ko pa nivo ROS preseže antioksidativno sposobnost celice, lahko pride do poškodb celic (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Ravnotežje med ROS in antioksidanti se poruši, če se zmanjša koncentracija antioksidantov, če se poveča koncentracija ROS oz. če pride do kombinacije obeh. Odziv na oksidativni stres vključuje zaznavanje povišane koncentracije ROS v celici in induciranje endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.2 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI (ROS)

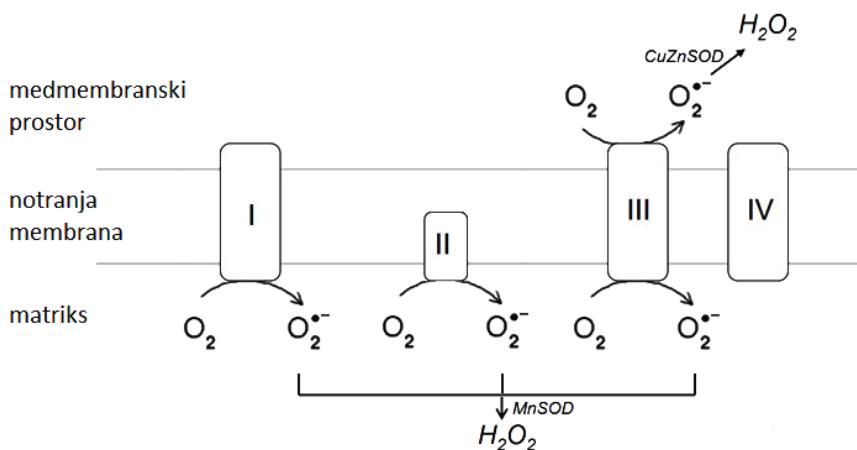
Kratica ROS predstavlja množico reaktivnih molekul in radikalov, ki nastanejo iz molekularnega kisika (Turrens, 2003). Radikali so nestabilne in zelo reaktivne oblike spojin, ki vključujejo enega ali več neparnih elektronov (Batič in Raspor, 2000).

2.2.1 Izvori ROS

ROS v celicah so endogenega ali eksogenega izvora (Abram, 2000). Nastajajo v normalnih celičnih metabolnih procesih in ob izpostavitvi zunanjim virom oksidacije (Batič in Raspor, 2000). Endogeni viri ROS so nekateri procesi v mitohondrijih, endoplazmatskem retikulumu, peroksisomih, citoplazmi in celični membrani (Abram, 2000). Natančneje so njihov vir flavoproteini, lipoksigenaže, hemoglobin, ciklooksigenaze, ksantin oksidaza in citokromi P450 (Korošec, 2000). Nastanejo tudi ob reakciji kisika z molekulami, kot so adrenalin, dopamin in tetrahidrofolati (Halliwell, 1996). Eksogeni viri ROS so ionizirajoče sevanje, ozon in razni sprožitelji, kot so cigaretni dim in različna onesnaževala, npr. organska topila in pesticidi (Abram, 2000; Batič in Raspor, 2000). Tudi nekatere snovi in zdravila (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki, ipd.) povzročijo nastanek ROS (Korošec, 2000).

Tudi kvasovke kot aerobni organizmi se morajo soočati s toksičnimi učinki molekularnega kisika, iz katerega nastajajo ROS. V kvasni celici se ravnotežje med ROS in antioksidanti poruši, če so celice izpostavljene različnim stresnim pogojem v okolju, kot so vročinski šok in prisotnost etanola, kovinskih ionov ter oksidantov, kot so vodikov peroksid, menadion in parakvat (Costa in Moradas-Ferreira, 2001; Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Glavni vir ROS v kvasni celici je dihalna veriga v mitohondrijih. Ta namreč porabi 85-90 % kisika v celici (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Molekularni kisik, ki se porablja med aerobnim metabolizmom, celice reducirajo do vode. Ta redukcija poteka v mitohondriju, kjer kompleks IV (citokrom oksidaza) prenese štiri elektrone na molekularni kisik. Iz ostalih redoks centrov v elektronski transportni verigi pa lahko elektroni "uhajajo" in povzročijo delno reduciranje molekularnega kisika do superoksidnega aniona (Turrens, 2003).



Slika 1: Mesta nastanka superoksidnega aniona in vodikovega peroksida v mitohondrijski dihalni verigi (Turrens, 2003)

Redukcija molekularnega kisika do vode se zgodi v štirih korakih, kjer se prenaša po en elektron. Tako nastanejo reaktivni delno reducirani intermediati, kot so superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) (Enačba 1), vodikov peroksid (H_2O_2) (Enačba 2) in hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) (Enačba 3) ter v zadnjem koraku najbolj reducirana oblika molekularnega kisika, voda (Enačba 4) (Korošec, 2000). Poleg tega lahko iz osnovnega stanja kisika (triplet kisik), nastane singlet kisik (Sies, 1997). Molekularni kisik je v osnovnem stanju biradikal in vsebuje dva neparna elektrona v zunanjji lupini (triplet kisik). Ta dva elektrona imata enak spin in zato lahko kisik reagira le z enim elektronom naenkrat. V tem primeru ni zelo reaktivен. Če pa je eden od obih neparnih elektronov vzbujen in spremeni spin, nastane singlet kisik, ki je močan oksidant (Turrens, 2003).



2.2.2 Glavne vrste ROS

Najpomembnejše ROS v celici so (Korošec, 2000; Abram, 2000):

- radikali: superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal (HO^\cdot), alkoksilni radikal (RO^\cdot), radikal dušikovega oksida (NO^\cdot), hidroperoksilni radikal (HOO^\cdot), alkilperoksilni radikal (ROO^\cdot) in fenoksilni radikal (ArO^\cdot),
- ostalo: singletni kisik ($1O_2$) in vodikov peroksid (H_2O_2).

Oksidante, ki so derivati radikala dušikovega oksida, se v zadnjem času imenujejo tudi reaktivne dušikove spojine (Turrens, 2003).

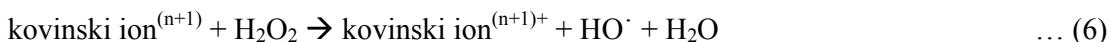
- Superoksidni anion

Eden najbolj pogostih radikalov v celicah je superoksidni anion. Največ ga nastane med mitohondrijskim dihanjem na elektronski transportni verigi (Santoro in Thiele, 1997). Po ocenah se 1-3 % kisika, ki ga zajamemo z dihanjem, porabi za nastanek superoksidnega aniona. Nadaljnji izračun pokaže, da v naših telesih nastane več kot 2 kg superoksidnega aniona na leto (Halliwell, 1996). Superoksidni anion sam po sebi ni zelo reaktivni radikal, spodbudi pa nastajanje drugih zelo reaktivnih ROS. Odstranjevanje superoksidnega aniona s superoksid dismutazo, pripelje do nastanka vodikovega peroksida in kisika (Enačba 5) (Santoro in Thiele, 1997).



- Vodikov peroksid

Vodikov peroksid nima neparnih elektronov in kot tak ne spada med radikale. Lahko prečka biološke membrane in je ključni reaktant pri nastanku zelo reaktivnih hidroksilnih radikalov. Hidroksilni radikal lahko nastane iz vodikovega peroksidu spontano ali v Fenton reakciji (Enačba 6), ki jo katalizirajo kovinski ioni v reducirani obliki. Reducirane oblike kovinskih ionov, npr. Fe(II), Cu(I), Ti(III), lahko nastanejo v Haber-Weiss reakciji (Enačba 7). Odstranjevanje vodikovega peroksidu vršijo katalaze (Enačba 8) in glutation peroksidaze (Enačba 9) (Santoro in Thiele, 1997).



- Hidroksilni radikal

Vsakršno povečanje superoksidnega aniona, vodikovega peroksida in redoks aktivnih kovinskih ionov spodbudi nastanek hidroksilnih radikalov. Hidroksilni radikali, skupaj z ostalimi ROS, tvorijo nove radikale, kot so alkoksilni in peroksilni radikali v lipidih, ki še bolj poškodujejo celico (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.2.3 Delovanje ROS

Neutralizacija radikalov je dokončna, ko iz njih nastane neradikalni ali nereaktivni končni produkt (Sies, 1997). Če se srečata dva radikala, lahko tvorita kovalentno vez tako, da združita neparna elektrona. Ko pa se srečata radikal in neradikal, nastane nov radikal. Ker večina bioloških molekul ni radikalov, nastanek radikalov *in vivo* pogosto sproži verižno reakcijo (Halliwell, 1996).

ROS, predvsem superoksidni anion, hidroksilni radikal, vodikov peroksid in singlet kisik, poškodujejo celične sestavne dele z oksidacijo lipidov, proteinov in nukleinskih kislin (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Kopiranje oksidiranih molekul v celici je povezano s staranjem in celično smrtjo (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Oksidacije nukleinskih kislin vodijo v poškodbe baz in sladkorjev, cepljenje verige in povezav med DNA in proteini. Eden od glavnih produktov poškodovanih baz je 8-hidroksigvanin. Kljub temu, da superoksidni anion in vodikov peroksid ne reagirata direktno z DNA, iz njiju nastaja hidroksilni radikal, ki poškoduje DNA (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Oksidacija lipidov povzroči nastanek krajših verig maščobnih kislin, kar poveča fluidnost celičnih membran. Visoke koncentracije vodikovega peroksida preko lipidne oksidacije povečajo nastanek malondialdehida, ki je direktno povezan s stopnjo nenasičenih maščobnih kislin, prisotnih v celični membrani. Dodatno lahko nekateri končni produkti lipidne oksidacije, kot so epoksiidi, aldehydi in alkani poškodujejo DNA in inaktivirajo proteine (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Oksidativne poškodbe proteinov vključujejo oksidacijo aminokislin in tvorbo agregatov, kar vodi do povečane dovetnosti za proteolizo in zmanjšane biološke aktivnosti (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Superoksidni anion specifično oksidira železo-žveplove centre v aktivnih mestih encimov, pri čemer se železo sprosti in encim postane neaktivен. Vodikov peroksid encime inaktivira z oksidacijo tiolne skupine cisteina v aktivnem mestu, saj oksidacija tiolne skupine vodi do nastanka disulfidnih vezi med cisteini v proteinu. Prav tako oksidira tudi metionin v metionin sulfoksid ali sulfon. Hidroksilni radikali oksidirajo histidin, arginin, lizin in prolin. Proteini so z nastankom metionin sulfona in ogljikovih derivatov ireverzibilno inaktivirani (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Toksičnost ROS je odvisna od njihovih lastnosti, in sicer od mesta nastanka, reaktivnosti, koncentracije in sposobnosti difuzije. Pomembno je tudi fiziološko stanje celice z ozirom na to, kako hitro se deli, ali izvaja biosintetične reakcije in katerim stresom, ki lahko še poslabšajo oksidativni stres, je celica dodatno izpostavljena (Santoro in Thiele, 1997).

ROS so udeležene pri številnih normalnih in patoloških procesih v telesu. Nezadostnost oz. neučinkovitost endogenega antioksidativnega obrambnega sistema človeka in živali, se izrazi z boleznimi, kot so rak, sladkorna bolezen, očesna mrena, revmatoidni artritis, ateroskleroza, nevrodegenerativne bolezni, kot so Alzheimerjeva, Parkinsonova in Crohnova bolezen, prezgodnji porod, srčno-žilne bolezni, zmanjšana imunska odzivnost, bolezen jeter in ledvic, okvare dihalnih funkcij, zastrupitve itd. (Korošec, 2000; Raspot in sod., 2000).

2.3 OKSIDATIVNI STRES IN PROTEOM

Oksidativni stres vpliva na izražanje proteinov in povzroča njihove modifikacije. Celice, ki so izpostavljene oksidativnemu stresu, se branijo z vrsto mehanizmov. Ti vključujejo preklope metabolnih poti, sintezo novih za nadomeščanje poškodovanih proteinov in aktivno razgradnjo poškodovanih proteinov. Celični odziv vključuje spremembe v vsebnosti proteinov, posttranslacijske spremembe in oksidativne poškodbe proteinov (Rabilloud in sod., 2005).

Oksidativni stres inducira izražanje antioksidativnih proteinov, šaperonov in proteaz. Šaperoni ponovno zvijejo proteine, ki so se odvili zaradi oksidativnega stresa, proteaze pa razgradijo irreverzibilno poškodovane proteine. S tem se celica izogne škodljivemu delovanju poškodovanih encimov. Obenem se zaradi oksidativnega stresa zmanjša vsebnost nekaterih drugih proteinov v celici, kot posledica razgradnje irreverzibilno poškodovanih proteinov (Rabilloud in sod., 2005).

Raziskane so bile spremembe v izražanju proteinov *Saccharomyces cerevisiae*, kot odziv na oksidativni stres, inducirani s peroksidami. Zanimivo je, da je induciranje endogenega antioksidativnega obrambnega sistema pri tem sekundarnega pomena. Celica se na oksidativni stres namreč odzove z močno spremembo centralnega metabolizma. Glikoliza se zmanjša, pot pentozne fosfata pa se poveča. Medtem ko v glikolizi nastaja NADH, v poti pentozne fosfata nastaja NADPH. Ta reducirajoč koencim uporablja nekateri endogeni antioksidativni obrambni sistemi v evkariontih, npr. glutation reduktaza (Rabilloud in sod., 2005).

Večina proteomskeih študij oksidativnega stresa uporablja dvodimensionalno elektroforezo (2-DE) kot orodje za ločevanje in kvantifikacijo proteinov. Kljub slabosti, da v 2-DE ne zajamemo vseh razredov proteinov, med njimi membranskih proteinov, je ta metoda še vedno najboljše orodje, ko imamo opravka s celotnim proteomom.

Tehnika omogoča ločevanje proteinov glede na izoelektrično točko (pI) v 1. dimenziji, s čimer lahko zaznamo mnogo posttranslacijskih modifikacij. Najbolj tipičen primer, ki spremeni pI, je fosforilacija (Rabilloud in sod., 2005). V 2. dimenziji gre za ločevanje proteinov glede na molekulske maso (Sepčić in sod., 1997).

2.4 ENDOGENI ANTOOKSIDANTIVNI OBRAMBNI SISTEM

Antioksidativni obrambni sistem je pomemben za preprečevanje in popravilo oksidativnih poškodb v celicah (Korošec, 2000). Antioksidant je vsakršna snov, ki je prisotna v nizkih koncentracijah v primerjavi z oksidirajočim substratom in odloži ali prepreči oksidacijo substrata. Npr., v bioloških membranah je potreba po enem do treh antioksidantih na 1000 potencialnih tarčnih molekul (Sies, 1997). Kako preprečiti oksidacijo, je odvisno od vrste antioksidanta (Abram, 2000).

2.4.1 Vrste antioksidantov

Pred poškodbami se celica zaščiti z različnimi biokemijskimi mehanizmi, ki so se razvili skozi evolucijo (Batič in Raspor, 2000). Zaščita pred ROS vključuje sintezo neencimov, kot sta glutation in tioredoksin ter encimov, kot so superoksid dismutaza, katalaza in tioredoksin peroksidaza (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Antioksidanti imajo različne topnosti in različno prehajajo skozi tkiva, celice in makromolekulske strukture. Poznamo vodotopne antioksidante (askorbat, glutation in urat), lipidotopne (tokoferoli in karotenoidi) in antioksidante, ki so nekje vmes (flavonoidi in hidroksicimetne kisline) (Eastwood, 1999).

Nekatere antioksidante sintetizira telo samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo z živili (vitamini, kovine v sledovih) (Korošec, 2000).

2.4.2 Endogeni antioksidativni obrambni sistem kvasovke *S. cerevisiae*

Kvasne celice lahko gojimo v aerobnih pogojih in jih tako izpostavimo ROS, ki nastajajo kot stranski produkt celičnega metabolizma. Oksidativne poškodbe, ki bi jih v celici povzročile ROS, v normalnih fizioloških pogojih preprečijo endogeni antioksidativni obrambni sistemi, ki nevtralizirajo ROS (primarna obramba) in popravljalni sistemi (sekundarna obramba) (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Nekateri antioksidativni obrambni sistemi so stalno prisotni, medtem ko so drugi inducirani kot odziv na oksidativni stres (Santoro in Thiele, 1997).

Preglednica 1: Primarni in sekundarni endogeni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Costa in Moradas-Ferreira, 2001)

Primarni sistemi	Funkcija
Encimski	
Cu, Zn-superoksid dismutaza	Odstranjevanje O_2^- v citoplazmi
Mn-superoksid dismutaza	Odstranjevanje O_2^- v mitohondriju
Katalaza A	Razgradnja H_2O_2 v peroksisomih
Katalaza T	Razgradnja H_2O_2 v citoplazmi
Citokrom-C-peroksidaza	Razgradnja H_2O_2 v mitohondriju
Glutation-peroksidaza	Razgradnja H_2O_2 in lipidnih hidroperoksidov
Glutation-reduktaza	Redukcija oksidiranega glutationa
Tioredoxin-peroksidaza	Razgradnja alkiliranih hidroperoksidov
Tioredoxin-reduktaza	Redukcija oksidiranega tirodoksin
Glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza	Redukcija $NADP^+$ v NADPH
Neencimski	
Glutation	Odstranjevanje prostih radikalov, združevanje z elektrofilni
Metalotioneini	Vezava Cu, odstranjevanje O_2^- in HO^-
Tioredoxin	Redukcija oksidiranega glutationa
Poliamini	Vezava Cu, zaščita lipidov pred oksidacijo
Ubikvinon	Lovljenje prostih radikalov
Sekundarni sistemi	
8-okso-gvanin-glikozilaza/liaza	Irezovanje oksidiranih DNA baz
AP-endonukleaza	Rezanje apurinskih/apirimidinskih (AP) mest
	Tvorba 3'-hidroksilnih skupin na AP mestih
Metionin-sulfoksid-izomeraza	Redukcija metionin-sulfoksidov
Protein-disulfid-izomeraza	Redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Glutation	Redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Tioredoxin	Redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Proteini vročinskega šoka (Hsp)	Sodelujejo pri razgradnji oksidiranih proteinov

V specifičnih stresnih pogojih, ko koncentracija ROS preseže antioksidativno zmogljivost, se kvasna celica znajde v oksidativnem stresu. Kvasovke lahko zaznajo oksidativnen stres in so se sposobne nanj odzvati z indukcijo primarnega in sekundarnega antioksidativnega obrambnega sistema. Prilagoditev na stresne razmere vključuje zgodnje odzive, ki zagotovijo takojšnjo zaščito proti subletalnim stresnim pogojem in pozne odzive, ki zagotovijo bolj učinkovito zaščito proti resnemu stresu in omogočijo celicam vrnitev v ne-stresne pogoje. Zgodnji odzivi so posttranslacijska aktivacija že prej obstoječih obrambnih sistemov in aktivacija signalnih poti, ki aktivirajo pozne odzive. Pozni odzivi so induciranje antioksidativnih obrambnih sistemov (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.5 EKSOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM

Poleg endogenih antioksidantov poznamo tudi eksogene, ki jih dobimo z živili ali prehranskimi dopolnili (Kreft in sod., 2000). Z ustreznim uživanjem antioksidantov lahko v organizmu vzpostavimo ravnotežje med antioksidanti in ROS, in tako preprečimo nastanek z ROS povezanih bolezni. Spisek današnjih živil z izraženo antioksidativno učinkovitostjo temelji predvsem na rastlinskih proizvodih (Raspor in sod., 2000).

2.5.1 Propolis

Propolis je splošno ime za smolnato snov, ki jo čebele nabirajo iz različnih rastlinskih virov. Beseda propolis izhaja iz grške besede *pro-*, obramba in *polis-*, mesto. Njen dobesedni prevod je torej obramba mesta oz. panja. Čebele nabirajo smolo iz razpok v lubju dreves in listnih brstih. Smolo nato prežvečijo, ji dodajo encime iz sline, delno prebavljen material pa zmešajo z voski in uporabijo v panju (Burdock, 1998). Čebele uporabljajo propolis za najrazličnejše namene. Z njim zamašijo razpoke in špranje, tako, da je panj neprodušno zaprt. Zato imenujemo propolis tudi zadelavina. Uporabljajo ga za grajenje obrambnih pregrad tik za vhodno odprtino v panj, popravilo satja, krepitev sten, mazanje in glajenje notranjih sten panja in prekrivanje satov tako, da so celice, preden matica vanje leže jajčeca, razkužene. Različne vsiljivce čebele balzamirajo s propolisom in tako preprečijo trohnenje in gnitje, s tem pa tudi širjenje okužb in bolezni (Pedrotti, 2003). Ena čebelja družina nabere na leto 100 do 150 g propolisa (Božnar, 2002).

Barva propolisa je odvisna od izvora in starosti propolisa. Lahko je zelenorumen do temnorjav, včasih črn, pogosto z rdečkastim odsevom (Pedrotti, 2003). Propolis je trd in krhek, ko je mráz ter mehak in lepljiv, ko je vroče (Burdock, 1998). Aroma je prijetna, diši po topolovih popkih, medu, vosku in vaniliji. Če ga sežgemo je vonj podoben kadilu (Božnar, 2002).

2.5.1.1 Vir in sestava propolisa

Sestavine surovega propolisa izvirajo iz treh virov: rastlinskih izločkov, ki jih nabirajo čebele, izločenih snovi iz čebeljega metabolizma in materialov, ki so vpleteni pri izdelavi propolisa (Marcucci, 1995). Za vir rastlinskih izločkov so včasih smatrali samo topole, vendar so to domnevno opustili, ker so čebele izdelovale propolis tudi blizu ekvatorja, kjer topolov ni. Ker sestavine propolisa odražajo vir, so analize sestave propolisa pokazale, da so lahko vir tudi nekatera druga drevesa, med katerimi so tudi breza, brest, jelša, bukev, iglavci, divji kostanj, sliva, češnja, breskev in marelica (Burdock, 1998).

Približno polovica propolisa so smole, v katerih se nahajajo flavonoidi ter fenolne kisline in njihovi estri. Okoli 30 % je voskov in maščobnih kislin, 10 % eteričnih olj, 5 % cvetnega prahu in 5 % drugih organskih snovi, mineralov (Mg, Ca, K, Na, Cu, Zn, Mn, Fe) ter vitaminov B1, B2, B6, C in E (Božnar, 2002). Vsebuje preko 200 sestavin, med katerimi je največ flavonoidov. Predvideva se, da so nekateri flavonoidi spremenjeni z encimi v slini čebel (Burdock, 1998).

Kljud temu, da je etanolni izvleček propolisa (EIP) najpogosteji, so za ekstrakcijo sestavin uporabili tudi druga topila. V propolisu so identificirali naslednje komponente: alkohole, aldehyde, alifatske kisline in alifatske estre, aminokisline, aromatske kisline, aromatske estre, kalkone in dihidrokalkone, flavanone, flavone in flavonole, ogljikovodikove estre in estre, hidroksi in keto voske, voskaste kisline, ketone, terpenoide, steroide in sladkorje (Marcucci, 1995).

Kemična sestava propolisa je različna in je odvisna od rastlinja na mestu nastanka. Zaradi geografskih razlik imajo vzorci propolisa iz Evrope, Južne Amerike in Azije različne kemične sestavine. Običajno propolis vsebuje polifenole (flavonoide, fenolne kisline in njihove estre), terpenoide, steroide in aminokisline. Propolis iz Evrope in Kitajske vsebuje veliko flavonoidov in estrov fenolnih kislin. Nasprotno, brazilski propolis vsebuje več terpenoidov in preniliranih derivatov *p*-kumarne kisline. Zaradi razlik v sestavi so tudi biološke aktivnosti propolisa iz različnih območij različne (Kumazawa in sod., 2004).

2.5.1.2 Uporaba propolisa

Propolis lahko uporabljam, kot vodni ali alkoholni izvleček (Božnar, 2002). Najpogosteji način priprave propolisa je ekstrakcija frakcije, ki je topna v etanolu. Priprava vključuje malo korakov. Surov propolis se najprej spere z mrzlo vodo in nato raztopi v 95 % etanolu, da se odstranijo voski in organski ostanki. Končni korak je filtracija. Tako nastane propolisna tinktura, propolisov balzam oz. EIP (Burdock, 1998).

Propolis so uporabljali že starci Egipčani, njegova uporaba pa se nadaljuje še danes v domačih zdravilih in pripomočkih za osebno nego (Burdock, 1998). Slovi po svojih protibakterijskih, protivirusnih, protiglivnih, protivnetnih, protirakavih, antioksidativnih lastnostih in deluje kot sredstvo za strjevanje krvi, mišični relaksant in anestetik (Burdock, 1998; Kumazawa in sod., 2004).

Zaradi svojih bioloških lastnosti se propolis uporablja kot dodatek k živilom za izboljšanje zdravja in preprečevanje bolezni, kot so vnetja, srčno-žilne bolezni, diabetes in rak (Kumazawa in sod., 2004).

Uporablja se v dermatoloških izdelkih, kjer pomaga pri celjenju ran, regeneraciji tkiva, zdravljenju opeklina, nevrodermatitisa, psoraze, herpesa in dermatofitov; pri zdravljenju revme in zvinov; v dentalni medicini kot anestetik ter v zobnih pastah, ustnih vodicah in zobni nitki, za zdravljenje gingivitisa, heilitisa in stomatolitisa; v kozmetičnih produktih, kot so kreme za obraz in losjoni za telo (Burdock, 1998). Oviri pri uporabi propolisa v medicinske namene sta nestandardna surovina in velika možnost alergije (Božnar, 2002).

2.5.1.3 Antioksidativna učinkovitost propolisa *in vitro*

Kljb različni sestavi, propolis različnega geografskega porekla kaže antioksidativno učinkovitost. Cilj večine raziskav *in vitro* je poiskati povezavo med antioksidativno učinkovitostjo in fenolnimi oz. flavonoidnimi spojinami.

Propolis je pomemben vir fenolnih spojin (Božnar, 2002) in domneva se, da so prav te zaslužne za njegove biološke lastnosti (Kumazawa in sod., 2004). Antioksidativno učinkovitost propolisa pripisujejo veliki vsebnosti flavonoidov (Božnar, 2002; Kumazawa in sod., 2004). Poleg flavonoidov so zaradi svojih antioksidativnih lastnosti zanimive tudi druge fenolne spojine, npr. kavna kislina (Kumazawa in sod., 2004) in njeni derivati (Gregoris in Stevanto, 2010).

Silva in sod. (2006) so pokazali, da imajo nekateri brazilski izvlečki propolisa močno linearno povezavo med vsebnostjo fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo. Obstajajo pa drugi, pri katerih je ta povezava šibka. Po drugi strani je povezava med flavonoidi in antioksidativno učinkovitostjo propolisa očitnejša. Isla in sod. (2001) navajajo, da je povezava med vsebnostjo flavonoidov v argentinskem propolisu in lovljenjem radikalov pomembna, medtem ko so pri preprečevanju peroksidacije lipidov poleg vsebnosti flavonoidov prisotni še drugi dejavniki.

Ahn in sod. (2004) so pokazali, da korejski propolis z močno antioksidativno učinkovitostjo vsebuje velike količine antioksidativnih snovi, kot so kavna kislina, kamferol in fenetilni ester kavne kisline (CAPE). Za razliko od njega kitajski propolis z močno antioksidativno učinkovitostjo, ki vsebuje velike količine antioksidativnih substanc, kot so kavna kislina, ferulna kislina in CAPE (Ahn in sod., 2007). Kumazawa in sod. (2004) so primerjali antioksidativno učinkovitost propolisa različnih geografskih regij (Argentina, Avstralija, Brazilija, Bolgarija, Čile, Kitajska, Madžarska, Nova Zelandija, Južna Afrika, Tajska, Ukrajina, Urugvaj, ZDA in Uzbekistan). Propolis z močno antioksidativno učinkovitostjo je vseboval antioksidativne komponente, kot so kamferol in CAPE. Gregoris in Stevanato (2010) povezujeta antioksidativno učinkovitost propolisa s kavno kislino in njenimi estri CAPE in 1,1-dimetilalilkafetat (DMAC).

Laskar in sod. (2010) poročajo, da imajo v Indiji vodni izvlečki propolisa (VIP) večjo antioksidativno učinkovitost, kot EIP. To je v popolnem nasprotju s prejšnjimi izsledki raziskav. Kot vzrok navajajo višjo koncentracijo polifenolnih spojin v VIP.

2.5.1.4 Antioksidativna učinkovitost propolisa *in vivo*

Sun in sod. (2000) so preverili antioksidativno učinkovitost propolisa na podganah (samci). Med kontrolno skupino in skupino izpostavljeni živilu z 1 % propolisom, se je pokazala razlika v koncentraciji lipidne peroksidacije v gastrointestinalnem traktu. Signifikantna razlika se je pokazala po 8 tednih v debelem črevesu. V želodcu in tankem črevesu so bile koncentracije lipidne peroksidacije višje pri kontrolni skupini, kot pri skupini izpostavljeni propolisu, vendar razlike niso bile statistično značilne. Tudi Kanbur in sod. (2009) so ugotavljali antioksidativno učinkovitost propolisa na podganah (samice). 12 podgan so razdelili v 2 skupini. Prva skupina je služila kot kontrola, drugo pa so izpostavili 100 mg propolisa na kg suhe teže na dan. Merili so aktivnost superoksid dismutaze, glutation peroksidaze in katalaze in koncentracijo malonaldehida v eritrocitih in tkivu podgan. Med kontrolno skupino in skupino izpostavljeni propolisu ni bilo nobenih statističnih razlik med parametri, izmerjenimi v eritrocitih, jetrih, ledvicah in možganih.

Jasprica in sod. (2007) so zasnovali študijo, v katero so vključili 47 zdravih posameznikov obeh spolov, da bi raziskali, ali dnevni odmerek praškastega ekstrakta propolisa 30 dni zaporedoma, vpliva na aktivnost superoksid dismutaze, glutation peroksidaze in katalaze in koncentracijo malonaldehida v eritrocitih. Pri moških se je po 15 dneh izpostavitev propolisu koncentracija malonaldehida zmanjšala za 23,2 %. Po 30 dneh se je pokazalo tudi statistično značilno zvišanje aktivnosti superoksid dismutaze, in sicer za 20,9 %. Pri ženskah se merjeni parametri niso spremenili. Nespremenjene parametre pri ženskah razlagajo z nekoordiniranimi menstrualnimi ciklusi. Estrogen kot antioksidant, namreč vpliva na izražanje antioksidativnih encimov in stopnjo peroksidacije lipidov.

2.6 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno –OH skupino vezano na aromatski obroč. Spojine, ki imajo več kot eno –OH skupino vezano na en ali več aromatskih obročev, imenujemo polifenoli (Vermerris in Nicholson, 2008). Polifenoli so zanimive fitokemikalije t.j. kemikalije, ki izvirajo iz rastlinskega materiala in imajo potencialno ugodne učinke za zdravje človeka (Bors in sod., 1996).

Fenolne spojine so ubikvitarnе sestavine višjih rastlin. Najdemo jih v živilih rastlinskega izvora, npr. sadje, zelenjava, čaj, kava in vino. Te sestavine so sekundarni metaboliti, ki jih rastline proizvajajo za zaščito pred ultravijoličnim sevanjem in patogeni.

Mnogo spojin je pritegnilo pozornost kot potencialni zaščitni faktorji pri človeških nevrodегenerativnih boleznih, raku in srčno-žilnih boleznih (Farah in Donangelo, 2006). Fenolnim spojinam njihova struktura omogoča lovjenje radikalov in keliranje kovinskih ionov (Bors in sod., 1996). So dobri donorji vodika ali elektronov, poleg tega so njihovi radikali relativno stabilni zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča (Abram, 2000).

Opisanih je bilo nekaj tisoč fenolnih spojin, katere lahko razdelimo v različne skupine glede na njihovo kemično strukturo, substituente v osnovni strukturi, povezavo z ogljikovimi hidrati in stopnjo polimerizacije. Priporoča pa se uporaba razdelitve po številu C-atomov v molekuli (Preglednica 2) (Abram, 2000).

Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000)

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C ₆	Fenoli
7	C ₆ C ₁	Fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	Fenetilocetne kisline
9	C ₆ C ₃	Hidroksicimetne kisline Fenetylpropeni Kumarini Izokumarini Kromom
10	C ₆ C ₄	Naftokinom
13	C ₆ C ₁ C ₆	Ksantoni
14	C ₆ C ₂ C ₆	Stilbeni Antrakinoni
15	C ₆ C ₃ C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ C ₃) ₂	Lignani Neolignam
30	(C ₆ C ₃ C ₆) ₂	Biflavonoidi
n	(C ₆ C ₃) _n	Lignini
	(C ₆) _n	Melanins
	(C ₆ C ₃ C ₆) _n	Kondenziram tanini

2.6.1 Fenolne spojine v propolisu

Propolis vsebuje različne fenolne kisline in flavonoide. V preglednici 3 so predstavljene fenolne spojine 96 % etanolnega izvlečka propolisa (96 % EIP) slovenskega porekla, ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008, določene z LC-MS.

Preglednica 3: Fenolne spojine etanolnega izvlečka propolisa (96 % EIP) slovenskega porekla, ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008, določene z LC-MS (Mavri in sod., 2010)

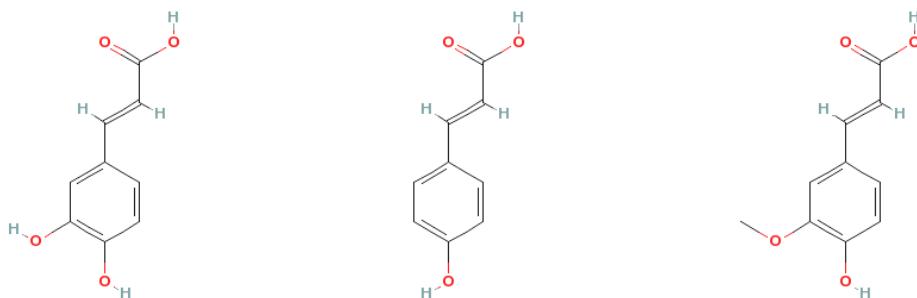
fenolna spojina	t_R^a (min)	96 % EIP^b (µg/ml)
galna kislina	4,13	0,49
klorogenska kislina	12,45	v sledeh
kavna kislina	15,70	359,67
p-kumarna kislina	21,61	465,26
ferulna kislina	23,16	225,56
rutin	24,10	1,17
elaginska kislina	24,69	10,34
miricetin	29,18	8,93
luteolin	33,84	53,51
kvercetin	34,07	96,72
formononetin ^c	35,09	11,98
benzilni ester kavne kisline ^c	36,45	148,12
pinobanksin ^c	36,73	292,28
apigenin	37,98	151,61
kamferol	38,64	161,15
izoprenilni ester kavne kisline ^c	42,24	448,12
izoprenilni ester kavne kisline ^c	42,83	571,65
CAPE	44,98	501,32
pinobanksin-3- <i>O</i> -acetat ^c	45,15	292,19
kamferid ^c	45,50	104,65
krizin	45,55	233,37
pinocembrin	45,88	226,57
galangin	46,80	188,17
cinamilni ester kavne kisline ^c	47,92	342,13

^a retencijski čas^b propolis ekstrahiran z zmesjo etanol / voda (96 : 4 v/v)^c identifikacija na podlagi MS/MS podatkov

2.6.1.1 Hidroksicimetne kisline

Hidroksicimetne kisline so široko razširjene v rastlinskem svetu in so zato pomemben vir antioksidantov. Pojav teh komponent v hrani znatno vpliva na stabilnost, barvo, okus, hranilno vrednost in druge lastnosti. Prav tako imajo nekatere hidroksicimetne kisline poleg antioksidativnih tudi druge biološke aktivnosti (Chen, 1997).

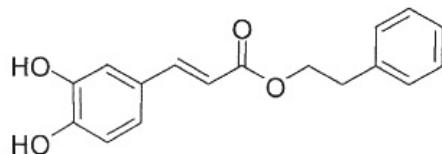
- Kavna, *p*-kumarna in ferulna kislina



Slika 2: Osnovna strukturna formula kavne kisline, *p*-kumarne kisline in ferulne kisline (NCBI, 2010a)

Kumazawa in sod. (2004) poročajo, da ima kavna kislina višjo sposobnost lovljenja radikalov 1,1-difenetil-2-pikrilhidrazil (DPPH[·]) (~80%) kot *p*-kumarna (~5%). Medtem ko Chen in sod. (1997) poročajo, da ima kavna kislina višjo sposobnost lovljenja radikalov DPPH[·] (51,5%) kot ferulna (~24,8%). Sposobnost lovljenja radikalov DPPH[·] torej upada v naslednjem vrstnem redu: kavna kislina > ferulna kislina > *p*-kumarna kislina. V istem vrstnem redu upada sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (Castelluccio in sod., 1995).

- CAPE



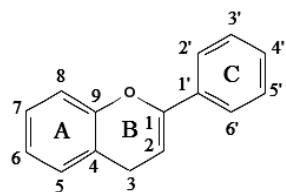
Slika 3: Osnovna strukturna formula CAPE (Kumazawa in sod., 2004)

CAPE je postal zanimiv zaradi svojih farmakoloških aktivnosti, predvsem kot eden izmed glavnih bioloških aktivnih komponent v propolisu, zaslužnih za protitumorsko delovanje. Z ozirom na to, so Russo in sod. (2002) raziskali antioksidativno učinkovitost propolisa z in brez CAPE ter preverili antioksidativno učinkovitost CAPE. Po njihovih rezultatih sodeč je CAPE pomemben antioksidant *in vitro*. Je močan lovilec radikalov (superoksidnega aniona in DPPH[·]), učinkovito preprečuje peroksidacijo linolne kisline in inhibira delovanje ksantin oksidaze. Ksantin oksidaza je vir superoksidnih anionov v evkariontskih celicah. Pri vseh metodah je bil propolis, ki je vseboval CAPE, bolj učinkovit kot propolis brez njega (Russo in sod., 2002).

Chen in sod. (1997) poročajo, da kavna kislina bolj inhibira oksidacijo lipidov kot CAPE, medtem ko ima CAPE malenkost višjo sposobnost lovljenja radikalov DPPH[·] (57,5 %), kot kavna kislina (51,5 %). V nasprotju s tem Kumazawa in sod. (2004) navajajo, da ima CAPE okoli 90 % sposobnost lovljenja radikalov DPPH[·].

2.6.1.2 Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine, zgrajene iz 15 C-atomov. Osnovno spojino sestavljajo strukture, ki jih označimo s C₆C₃C₆ (Vermerris in Nicholson, 2008). Flavonoidi predstavljajo zelo obsežno skupino struktur. Do sedaj je poznanih okrog 5000 različnih flavonoidov, ki se razlikujejo tako po oksidacijski stopnji heterocikličnega C₃ obroča, kot tudi po različnih substituentih na obročih A, B in C. V naravi so flavonoidi običajno glikozidi. Sladkorni del je lahko monosaharid (glukoza, galaktoza, manoza, arabinoza, ramnoza) ali pa tudi daljša veriga. Največkrat je sladkor vezan na C₃, lahko pa tudi na C₅ ali C₇ atom. Le redki flavonoidi imajo sladkor vezan na B obroču. Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon (Abram, 2000). Medtem ko večina flavonoidov obstaja v obliki glikozidov, najdemo v naravi tudi aglikone, ki so prav tako pomembni za zdravje, če ne še bolj (Bors in sod., 1996). Flavonoide ločimo po aglikonu na flavone, flavanole, katehine, flavanone, dihidroflavanole, flavan-3,4-diole, antocianidem izoflavone, neoflavone, kalkone, dihidrokalkone in avrone (Abram, 2000).



Slika 4: Osnovna struktura formula flavonoidov (Abram, 2000)

2.7 KVASOVKA *S. cerevisiae* V STACIONARNI FAZI RASTI KOT MODELNI ORGANIZEM

Mnogo od tega kar se naučimo, ko uporabljamo mikroorganizme kot modelni sistem za raziskovanje oksidativnega stresa, ima brez dvoma pomemben vpliv na razumevanje mehanizmov, s katerimi višji evkarionti obvladujejo oksidativni stres. Obvladovanje le tega pa je odločilnega pomena v biomedicinskih znanostih, saj je oksidativni stres povezan s številnimi nevrodgenerativnimi boleznimi, boleznimi srca in ožilja, rakom in procesom staranja (Santoro in Thiele, 1997).

Kvasovka *S. cerevisiae* je eden najbolj preprostih evkariontskih organizmov. Na prvi pogled se ne zdi najbolj primerna kot modelni organizem za študij bioaktivnih snovi, namenjenih človeški uporabi. Zdi se, da kot enocelični organizem ne predstavlja kompleksnosti človeka, katerega nekaj deset trilijonov celic pripada različnim celičnim tipom in je organiziranih v tkiva in organe. Povrh tega je kvasni genom sestavljen le iz 6000 genov (Goffeau in sod., 1996), medtem ko človeški genom vsebuje okoli 25000 kodirajočih regij (Pennesi, 2003). Pa vendar so bile študije, kjer so uporabili kvasovko *S. cerevisiae* kot modelni organizem, pomembne za razumevanje ključnih celičnih procesov, ki potekajo v višjih evkariontih, kot so celični cikel in metabolizem.

2.7.1 Prednosti kvasovke *S. cerevisiae*

Kvasovka kot modelni organizem ima določene prednosti pred večceličnim. Gojimo ga lahko na definiranih medijih, kar omogoča popoln nadzor nad njegovim kemičnim in fizikalnim okoljem. Kvasovka *S. cerevisiae* ima mnoge tehnične prednosti v primerjavi s človeškimi celicami. Njen življenjski cikel je hiter, traja namreč le uro in pol do dve uri pri 30 °C. Raste lahko posamezno v tekočem mediju in v kolonijah na trdnem gojišču, aerobno in anaerobno. Energijo lahko pridobiva s fermentacijo na glukoznem mediju ali z dihanjem na mediju iz virov ogljika, kot je etanol. Njeno gojenje ne zahteva drugačnih sterilnih tehnik kot običajno, niti dragega medija in vzdrževanja. Naštete lastnosti omogočajo enostavno, hitro in poceni raziskovanje.

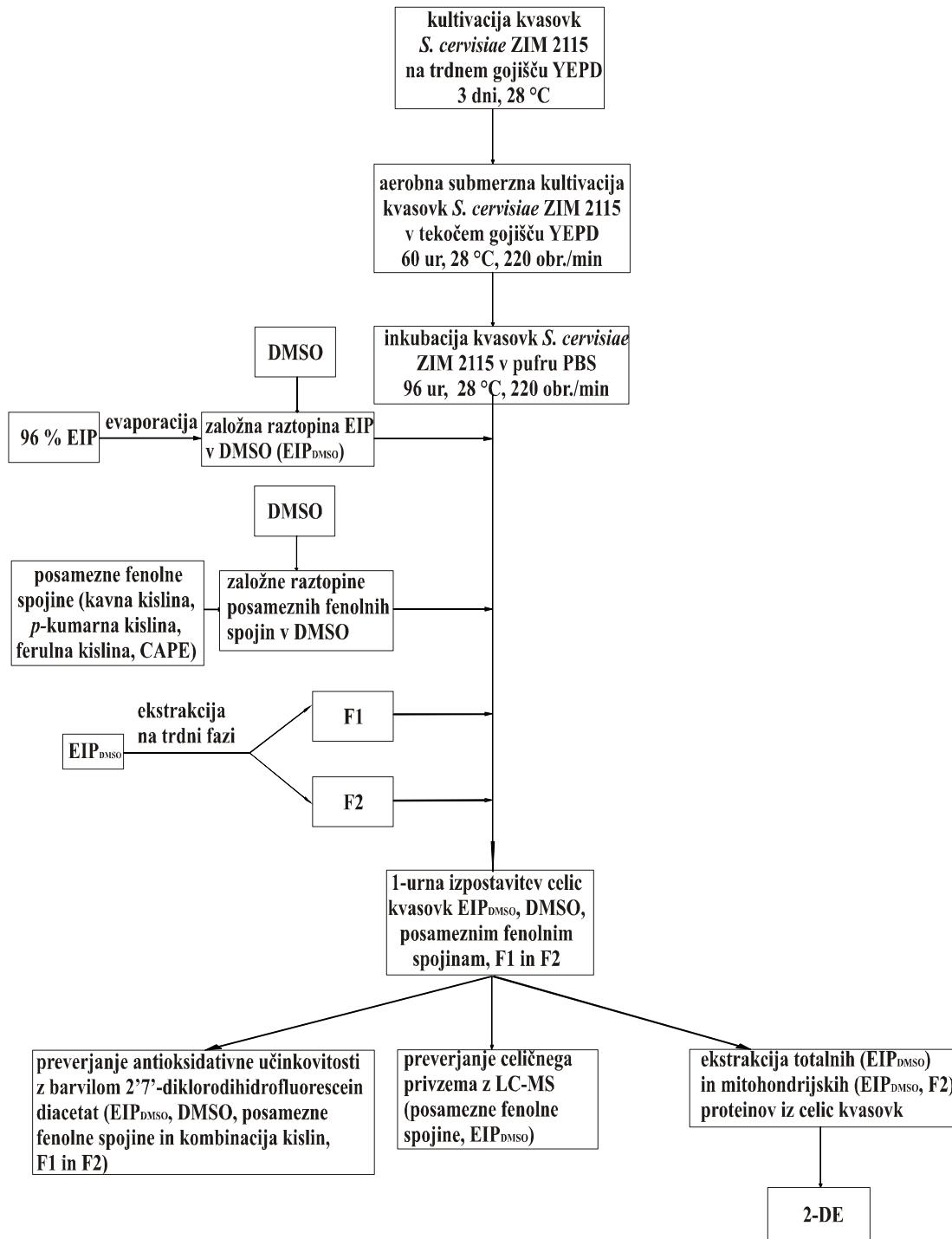
Genetsko je kvasovka *S. cerevisiae* zelo dobro definirana. Stabilna je tako v haploidni kot v diploidni obliki. Njen haploiden genom je pakiran v 16 dobro poznanih kromosomih (Menacho-Márquez in Marguía, 2007). Je zelo dojemljiva za genetske modifikacije. Kvasni genom je bil prvi sekvencioniran evkariontski genom, kar je omogočilo sestavljanje zbirk mutant s širokim spektrom spremenjenega genoma. Te zbirke omogočajo celoten pogled na delovanje bioaktivne snovi na evkarionta na genomske in proteomske ravni (Sturgeon in sod., 2006).

2.7.2 Stacionarna faza kvasovke *S. cerevisiae*

V mikroorganizmih, kot je kvasovka *S. cerevisiae*, je primarni regulator celičnega cikla razpoložljivost hranil. Kvasne celice v primeru stradanja zaustavijo rast in vstopijo v nebrsteče se stanje, imenovano stacionarna faza ali G0. V tem stanju se neto število celic ne povečuje več. Podobno vretenčarske celice v primeru pomanjkanja določenega rastnega faktorja vstopijo v fazo G0 (Fuge in sod., 1994). Ker so vretenčarske celice večino časa v tej fazi (Herman, 2002), je razumljivo, da se kvasovka *S. cerevisiae* uporablja kot modelni organizem prav v stacionarni fazni. Poleg omenjenega kvasovke v stacionarni fazi pridobivajo energijo le z dihanjem, kar je značilno tudi za višje evkarionte.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 5: Shematski prikaz poteka dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Propolis

Za analize antioksidativne učinkovitosti in spremembe proteoma kvasovke smo uporabili 96 % etanolni izvleček propolisa (96 % EIP), ki izvira iz Dolenjske regije, letnik 2008. Propolis smo do začetka analiz hranili v temi pri 4 °C.

3.2.2 Standardne fenolne spojine

Analizirali smo tudi antioksidativno učinkovitost posameznih standardnih fenolnih spojin, in sicer kavne kisline (Sigma), *p*-kumarne kisline (Sigma), ferulne kisline (Sigma) in fenetilnega estra kavne kisline (CAPE) (Sigma). Kavno, *p*-kumarno in ferulno kislino smo do začetka analiz hranili na sobni temperaturi, CAPE pa na -20 °C.

3.2.3 Dimetil sulfoksid (DMSO)

Za pripravo založne raztopine 96 % etanolnega izvlečka v DMSO (EIP_{DMSO}) in posameznih standardnih fenolnih spojin smo uporabili DMSO (Fluka).

3.2.4 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Za poskus smo uporabili tri dni staro kulturo, ki smo jo inkubirali na petrijevih ploščah s trdnim gojiščem YEPD pri 28 °C.

3.2.5 Gojišča

- Trdno gojišče YEPD

Trdno gojišče YEPD smo uporabili za precepljanje kulture.

Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča (Atlas in Lawrence, 1993)

sestavina	količina	končna koncentracija
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
agar (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
dodamo dH ₂ O do 1 L		

Gojišče smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga razlili v petrijevke.

- Tekoče gojišče YEPD

Tekoče gojišče YEPD smo uporabili za namnoževanje kulture do začetka stacionarne faze rasti.

Preglednica 5: Sestava tekočega gojišča (Atlas in Lawrence, 1993)

sestavina	količina	končna koncentracija
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
dodamo dH ₂ O do 1 L		

Gojišče smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.6 Raztopine in reagenti

3.2.6.1 Inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

- PBS pufer

PBS pufer smo uporabili za vzdrževanje kulture v stacionarni fazi rasti.

Preglednica 6: Sestava PBS pufra

sestavina	količina	končna koncentracija
1 tabletka (Oxoid)	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

Pufer smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.6.2 Preverjanje *in vivo* antioksidativne učinkovitosti EIP in posameznih fenolnih spojin

- Kalijev fosfatni pufer (pH=7,8)

50 mM kalijev fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo zmešali 50 mM kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄) (preglednica 7) in 50 mM kalijev hidrogenfosfat (K₂HPO₄) (preglednica 8) v določenem razmerju, da smo dosegli pH 7,8. Sterilizirali smo ga s filtracijo (velikost por: 0,2 µm).

Preglednica 7: Sestava 50 mM K₂HPO₄

sestavina	količina	končna koncentracija
KH ₂ PO ₄ (Merck)	3,40 g	50 mM
dodamo ddH ₂ O do 500 mL		

Preglednica 8: Sestava 50 mM KH₂PO₄

sestavina	količina	končna koncentracija
K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,35 g	50 mM
dodamo ddH ₂ O do 500 mL		

- 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA)

Preglednica 9: Sestava 1 mM založne raztopine H₂DCFDA

sestavina	količina	končna koncentracija
H ₂ DCFDA (Sigma)	0,0049 g	1 mM
etanol (96, Merck)	10 mL	

Uporabili smo sveže pripravljeno 1 mM raztopino H₂DCFDA.

3.2.6.3 Preverjanje celičnega privzema posameznih fenolnih spojin in EIP z LC-MS

- Metanol (Merck) za pripravo 50 % (w/v) raztopine metanola
- Mobilna faza A - metanojska kislina (Merck) za pripravo 1 % (w/v) raztopine metanojske kisline
- Mobilna faza B - acetonitril (Merck)

3.2.6.4 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

- Metanol (Merck) za pripravo 15 % (w/v) raztopine metanola
- 20 mmol/L raztopina amonijevega formiata (Fluka)

3.2.6.5 Ekstrakcija totalnih proteinov

- Ekstrakcijski pufer (PE)

Preglednica 10: Sestava ekstrakcijskega pufra (PE)

sestavina	količina	končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	1 g	4 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

PE smo alikvotirali po 2 mL in zamrznili na -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi. V novo Eppendorf centrifugirko smo odtehtali 0,02 g ditiotreitol (DTT) (Sigma) in vanjo prelili odtajan pufer tako, da je bila koncentracija DTT 65 mM.

Ko se je DTT raztopil, smo dodali še pol tablete inhibitorjev proteaz (IP) (Complete mini, Roche Diagnostics).

3.2.6.6 Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov

- "Cytosol/mitochondria fractionation" komplet

"Cytosol/mitochondria fractionation" komplet (Calbiochem) je vseboval:

- 5x citosolni ekstrakcijski pufer (CP),
- 1x mitohondrijski ekstrakcijski pufer (MP),
- 500 x raztopina IP in
- 1 M raztopino DTT.

3.2.6.7 Merjenje koncentracije proteinov

- Bradfordov reagent

Za uporabo smo Bradfordov reagent (Bio-Rad) 5x razredčili z ddH₂O.

- Goveji serumski albumin (BSA)

3.2.6.8 1. dimenzija

- Rehidracijski pufer (RP)

Preglednica 11: Sestava rehidracijskega pufra (RP)

sestavina	količina	končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	0,5 g	2 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µL	2 % (w/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 %
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

RP smo alikvotirali po 2 mL in zamrzili na -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi. V novo Eppendorf centrifugirko smo odtehtali 0,006 g DTT (Sigma) in vanjo prelili odtajan pufer tako, da je bila koncentracija DTT 18 mM.

- Mineralno olje (Sigma)

- Trakovi z immobiliziranim pH gradientom (IPG trakovi) 4-7, 3-10

3.2.6.9 2. dimenzija

- Ločilni gel

Preglednica 12: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida

sestavina	količina za 2 gela	končna koncentracija
akrilamid 30 % (w/v)/bisakrilamid 0,8 % (w/v)	15,7 mL	12 % (w/v)/0,3 % (w/v)
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8	9,8 mL	0,6 M
10 % (w/v) raztopina SDS	0,4 mL	4 % (w/v)
10 % (w/v) raztopina APS*	195 µL	4 % (w/v)
TEMED*	13 µL	
ddH ₂ O	13 mL	
skupaj	39,108 nm	

Raztopino APS in TEMED smo dodali k raztopini, ki smo jo predhodno razplinili v ultrazvočni kopeli (10 minut).

- Osnovni pufer za uravnovešenje

Preglednica 13: Sestava osnovnega pufra za uravnovešenje

sestavina	količina	končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8	5 ml	75 mM
urea (Sigma)	36 g	6 M
glicerol (Sigma)	30 mL	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2 g	2 % (w/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

Osnovni pufer za uravnovešenje smo alikvotirali po 40 mL in zamrznili na -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi.

Pufer za uravnovešenje I smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,2 g DTT v falkonko, ovito v folijo, dodali 20 mL osnovnega pufra za uravnovešenje, zmešali, da se je DTT raztoplil in razdelili v 2 epruveti po 10 mL.

Pufer za uravnoteženje II smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,96 g jodacetamida (JAA) v falkonko, ovito v folijo, dodali 20 mL osnovnega pufra za uravnoteženje, zmešali, da se je JAA raztopil in razdelili v 2 epruveti po 10 mL.

- Agarozna raztopina

Preglednica 14: Sestava agarozne raztopine

sestavina	količina	končna koncentracija
agaroza (Sigma)	0,5 g	0,5 % (w/v)
1x SDS elektroforezni pufer	100 ml	
BFM*	1 kristalček	

Bromfenol modro (BFM) smo dodali k raztopini, ki smo jo predhodno segreli v mikrovalovni pečici, da se je agaroza lažje raztopila. Raztopino smo alikvotirali v centrifugirke in hranili 1 mesec na sobni temperaturi.

- 1x SDS elektroforezni pufer

Preglednica 15: Sestava 1x SDS elektroforeznega pufra

sestavina	količina	končna koncentracija
tris-baza (Sigma)	3 g	25 mM
glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1 g	0,1 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1 L		

3.2.6.10 Barvanje gelov

- Fiksacijska raztopina

Preglednica 16: Sestava fiksacijske raztopine

sestavina	količina	končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	500 mL	50 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1 L		

- Barvilo SYPRO Ruby (Invitrogen)

- Raztopina za razbarvanje

Preglednica 17: Sestava raztopine za razbarvanje

sestavina	količina	končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	100 mL	10 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1 L		

3.2.7 Aparature in naprave

Pri delu smo poleg standardne laboratorijske opreme uporabljali tudi naslednje aparature in naprave:

Priprava gojišč, raztopin in reagentov

- pH-meter Seven multi (Mettler Toledo)
- parni sterilizator – avtoklav (Sutjeska)
- magnetno mešalo MM-540 (Tehtnica)
- tehtnica exellence (Sartorius)
- tehtnica PS 1200/C/2 (Radwag)

Kultivacija in inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

- brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- centrifuga 322A (Tehtnica)
- inkubator IG 150 (Jouan)
- mikroskop ATC 200 (Leica)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- spektrofotometer MA 9510 (Iskra)

Priprava založne raztopine EIP

- rotavapor R-215 (Buchi)

Preverjanje celičnega privzema posameznih fenolnih spojin in EIP z LC-MS

- binarna gradientna črpalka Agilent 1100, G1312A (Agilent Technologies)
- avtomatski podajalnik Agilent 1100, G1330B (Agilent Technologies)
- predkolona Gemini C18, 3 µL, 150 mm x 2,0 mm (Phenomenex)
- kolona Gemini C18, 4,0 x 2,0 mm (Phenomenex)
- masni spektrometer Micromass Quattro Micro (Waters) z elekrorazpršilno ionizacijo v negativnem načinu (ESI)
- program MassLynx 4,0 (Micromass)

Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

- kolona Strata-X 8B-S100-UBJ (Phenomenex)

Preverjanje *in vivo* antioksidativne učinkovitosti EIP in posameznih fenolnih spojin

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- črne 96-mestne mikrotitrskie ploščice (Nunc)

Ekstrakcija proteinov

- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)

Merjenje koncentracije proteinov

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- prozorne 96-mestne mikrotitrске ploščice (Nunc)

1. dimenzija

- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga miniSpin (Eppendorf)
- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- elektroforetska enota Multiphor II (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (Pharmacia Biotech)
- plastična plošča z vdolbinami
- elektrodní trakovi (GE Healthcare)
- elektrodi (anoda, katoda)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

2. dimenzija

- steklene plošče
- distančniki (1 mm)
- nosilci z vijaki
- nosilci
- stički
- ultrazvočna kopel (Sonis-Pio)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- SDS-PAGE posoda (zgornja in spodnja) (GE Healthcare)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

Barvanje gelov

- stresalna plošča (Biometra)
- plastične banjice 19,5 x 20,8 cm (Rotho)

Analiza slike in statistična analiza rezultatov

- program za analizo gelov 2-D Dymension (Syngene)
- sistem za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR – Gbox kamera (Syngene)

Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev

- zamrzovalnik (-20 °C) (LTH)
- hladilnik (4 °C) (LTH)
- zamrzovalnik Ultra Freeze (-80 °C) (Heto)

3.3 METODE

3.3.1 Priprava založne raztopine EIP

Uporabili smo očiščen 96 % EIP, v katerem je bilo predhodno določenih 29 ± 4 g/L skupnih fenolnih spojin s spektrofotometrično Folin-Ciocalten metodo (Kuraja, 2009).

Založno raztopino EIP_{DMSO} smo pripravili tako, da smo 1 mL 96 % EIP z rotavaporjem odparili 96 % etanol pri temperaturi 40 °C in nato suhi preostanek raztopili v DMSO do koncentracije skupnih fenolnih spojin 20 g/L.

3.3.2 Priprava založnih raztopin posameznih standardnih fenolnih spojin

Posamezne standardne fenolne spojine (CAPE, ferulna kislina, kavna kislina in *p*-kumarna kislina) smo vsako posebej zatehtali in raztopili v DMSO tako, da smo dosegli koncentracijo 20 g/L.

3.3.3 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

Pri SPE so komponente, ki jih želimo ekstrahirati porazdeljene med trdno in tekočo fazo. Vzorec, ki vsebuje želene komponente, nanesemo na ekstrakcijsko kolono s primernim polnilom (stacionarna faza). Površino polnila pred tem aktiviramo, da se merjene komponente vežejo in nato aktivacijsko topilo zamenjamo s tekočino, ki ima podobne lastnosti kot matriks. Želene komponente se ob prehodu skozi kolono ekstrahirajo iz tekoče v trdno fazo. Nezaželene komponente speremo iz kolone z vodnim topilom, polnilo osušimo in nato speremo želene komponente iz kolone z organskim topilom (Brodnjak-Vončina, 2006).

S SPE smo fenolne spojine v 96 % EIP ločili na dve frakciji glede na polarnost. Ekstrakcijo smo izvedli z uporabo kolone Strata-X. Kolono smo aktivirali z 2 mL metanola, aktivacijsko topilo pa odstranili z 2 mL 20 mmol/L amonijevega formiata. Sledil je nanos vzorca ($200 \mu\text{L}$ 96 % EIP + $200 \mu\text{L}$ 20 mmol/L amonijeve formiat). Nezaželene komponente smo iz kolone odstranili s spiranjem z 2 mL raztopine 15 % metanola v 20 mmol/L amonijevem formiatu, čemur je sledilo sušenje polnila z vakuumom (3 minute). Bolj polarno frakcijo 1 (F1) smo eluirali s 30 % metanolom, bolj nepolarno frakcijo 2 (F2) pa smo eluirali s 100 % metanolom. Nato smo obema frakcijama z rotavaporjem odparili topilo in vsaki dodali $200 \mu\text{L}$ DMSO.

3.3.4 Kultivacija kvasovk *S. cerevisiae* in izpostavitev EIP in posameznim fenolnim spojinam

Za precepljanje kulture smo uporabili trdno gojišče YEPD (Preglednica 4), za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase smo uporabili tekoče gojišče YEPD (Preglednica 5), za vzdrževanje kvasne biomase v stacionarni fazi rasti pa smo uporabili PBS pufer (Preglednica 6).

3 dni staro kulturo *S. cerevisiae* smo s trdnega gojišča YEPD precepili v 90 mL tekočega gojišča YEPD v 100-mL erlenmajericah s stransko kivetom (Borosilicate z 1 utorom) do optične gostote pri 650 nm (OD_{650}) 0,95. Nato smo prenesli 40 mL brozge v 360 mL tekočega gojišča YEPD v 1-L erlenmajericah s stransko kivetom (Shot duran z 1 utorom). Sledila je kultivacija kvasovk pri 28 °C in 220 obr./min do začetka stacionarne faze rasti.

Po 60 urah smo preverili OD_{650} (~1,8), vonj in mikroskopsko sliko brozge. Če so bili ti parametri ustrezni, smo 50 mL brozge (5×10^8 celic/mL) centrifugirali 3 minute pri 4000 obr./min (centrifuga 322A, Tehnica), odstranili supernatant ter sediment 1x sprali s PBS. Celice smo resuspendirali v 50 mL PBS in nato 40 mL suspenzije prenesli v 160 mL PBS, da smo dosegli koncentracijo 1×10^8 celic/mL v 500-mL erlenmajericah s stransko kivetom (Simex z 1 utorom). Sledila je inkubacija kvasovk nadaljnjih 96 ur pri 28 °C in 220 obr./min do točke določene v predhodnih poskusih, kjer je bilo fiziološko stanje kulture z vidika oksidacije stabilno.

Celični suspenziji (10 mL) smo dodali določen volumen:

- EIP tako, da smo dosegli koncentracijo fenolnih spojin v suspenziji 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 g/L,
- DMSO tako, da smo v suspenziji dosegli koncentracijo 1; 0,5 in 0,25 % (v/v),
- posamezne fenolne spojine in kombinacijo kislin tako, da smo v suspenziji dosegli koncentracijo 0,05 g/L in
- frakcij F1 in F2 tako, da smo dosegli ekvivalentno učinkovitost izpostavitve EIP_{DMSO} v koncentraciji 0,05 g/L.

Po 1-urni izpostavitvi pri 28 °C in 220 obr./min v temi smo preverili njihovo antioksidativno učinkovitost v celici, in sicer z merjenjem znotrajcelične oksidacije.

3.3.5 Preverjanje *in vivo* antioksidativne učinkovitosti EIP in posameznih fenolnih spojin z merjenjem znotrajcelične oksidacije

Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovk *S. cerevisiae* smo določili z barvilom 2',7'-diklorodihidrofluorescein (H₂DCF). Spojino smo dodali suspenziji celic v obliki diacetat estra. 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA) zaradi svoje nepolarnosti prehaja skozi celično membrano.

V celici ga esteraze deacetilirajo do oblike 2',7'- diklorodihidrofluorescein (H_2DCF), kar je bolj polarna oblika spojine, ki se zadrži v celici in se v prisotnosti oksidantov oksidira do diklorofluoresceina (DCF), ki fluorescira. Nastanek fluorescentne oblike barvila je indikator znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997).

V 2-mL Eppendorf centrifugirko smo prenesli 2 mL brozge in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf). Po odstranitvi supernatanta smo sediment 3x sprali s 50 mM kalijevim fosfatnim pufrom (pH 7,8) (Preglednica 7 in 8). Sedimentu smo nato dodali 990 μ L 50 mM kalij fosfatnega pufra (pH 7,8) in inkubirali 5 min pri 28 °C. Po končani inkubaciji smo dodali 10 μ L sveže pripravljene 1 mM raztopine H₂DCFDA (Preglednica 9). Eppendorf centrifugirke smo prenesli na stresalnik in inkubirali v temi 15 min pri 28 °C. Sledil je prenos vzorcev (200 μ L) v mikrotitrsko ploščico in merjenje fluorescence na čitalcu mikrotitrskih plošč. Valovna dolžina vzbujanja je bila 488 nm, emisije pa 520 nm. Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti fluorescenčne intenzitete glede na kontrolo - relativna fluorescenčna intenziteta (RFI).

3.3.6 Preverjanje celičnega privzema EIP in posameznih fenolnih spojin z LC-MS

Pred in po 1-urni izpostavitvi celic EIP oz. posameznim fenolnim spojinam v koncentraciji 0,05 g/L smo 10 mL brozge centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min (centrifuga 322A, Tehnica), supernatant filtrirali (velikost por: 0,2 μ m) in ga do analiz hranili pri -20 °C. 1 mL vzorcev smo prenesli v viale, redčili 20x z 1 % raztopino metanojske kisline in 50 % raztopino metanola ter analizirali profil fenolnih spojin s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masnim spektrometrom (LC-MS).

Tekočinska kromatografija se uporablja za ločevanje fenolnih spojin iz kompleksnih mešanic na osnovi različnih afinitet do stacionarne faze v koloni (Vermerris in Nicholson, 2008). Stacionarna faza, ki se uporablja v kolonah je narejena na osnovi silikagela. Nemodificiran silikagel predstavlja polarno stacionarno fazo, ki se ne uporablja veliko. Večino stacionarnih faz se pripravi tako, da silikagel kemično modificirajo, s čimer dobimo t.i. reverzno fazo (nepolarna stacionarna faza). Silikagel spremenimo tako, da nanj vežemo silanolne skupine, preko teh pa različno dolge alifatske verige (C2, C4, C8, C18) ali fenetilne, ciano, nitro skupine, ki dajejo nosilcu bolj ali manj nepolaren značaj. Mobilna faza, ki jo uporabljamo pri reverzni LC, je sestavljena iz mešanice vode in organskega topila. Čas, ki je potreben za elucijo določene snovi iz kolone (retencijski čas), je v veliki meri odvisen od razmerja med obema komponentama v mobilni fazi. Bolj polarni vzorci potrebujejo proporcionalno večji odstotek vode za elucijo iz kolone. Kolono navadno spiramo tako, da povečujemo odstotek organskega topila v mobilni fazi (Sepčić in sod., 1997). Spojine identificiramo na podlagi kombinacije retencijskega časa in masnega spektra. Masni spekter pridobimo z masnim spektrometrom, ki je povezan z opremo za tekočinsko kromatografijo. Masna spektrometrija je analitična metoda za določanje molekularne mase spojin.

Z masnim spektrometrom ne izmerimo neposredno molekulske mase (m), ampak razmerje mase in naboja (m/z) posameznih ionov. V večini eksperimentov je nabolj iona 1 tako, da je molekulska masa enaka m/z. Masna spektrometrija ima 3 korake: ionizacijo, masno analizo in detekcijo. Ioni se lahko tvorijo z razprševanjem molekul v močnem električnem polju, kar imenujemo elektrosprej ionizacija (ESI) (Vermerris in Nicholson, 2008).

Separacija fenolnih spojin je potekala na reverznofazni koloni z gradientom dveh mobilnih faz, mobilne faze A (1 % (w/v) raztopina metanojske kisline) in mobilne faze B (acetonitril). Posamezne fenolne spojine smo določili na osnovi retencijskih časov in molskih mas glede na standardne spojine. Identificirane spojine smo kvantificirali z uporabo programa Masslynx 4,0.

Preglednica 18: Gradient mobilne faze A (1 % raztopina metanojske kisline)

čas (min)	mobilna faza A (%)
0 - 5	90
5 - 50	90 - 40
50 - 52	40 - 20
52 - 60	20
60 - 70	20 - 90
70 - 80	90

Pogoji kromatografske ločbe:

- temperatura kolone 25 °C
- volumen iniciranja 20 µL
- pretok 0,200 mL/min

Pogoji ionizacije (ESI):

- napetost kapilare 3 kV
- napetost vhodne leče 25 V
- napetost ekstraktorja 5V
- temperatura izvora 100 °C
- temperatura razpršilnega plina 350 °C
- pretok razpršilnega plina 400 L/h
- pretok plina vhodne leče 50 L/h

Fenolne spojine smo ob prehodu iz kolone zaznali z UV detektorjem in vse grafe izrisali pri valovni dolžini 300 nm. Spojine, ki imajo polarni značaj, imajo krajši retencijski čas in se prej izločijo iz kolone kot nepolarne spojine, ki imajo daljši retencijski čas.

3.3.7 Ekstrakcija totalnih proteinov

Po 1-urni izpostavivti celic EIP v koncentraciji 0,05 g/L smo odvzeli 2x po 2 mL brozge, centrifugirali 5 min pri 14 000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf), zavrgli supernatant in sedimentu dodali 250 µL PBS (Preglednica 6). Nato smo združili vzorca in še enkrat centrifugirali 5 min pri 14 000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf). Po odstranitvi supernatanta smo sediment 3x sprali s PBS. Na koncu smo supernatant zavrgli, sediment pa zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri -80 °C. Vzorce zamrznjene na -80 °C smo odtajali na ledu, jim dodali pol žličke cirkonij-kremenčevih kroglic in 200 µL PE (Preglednica 10), vrtinčili 5x1 min, z vmesnimi 1-minutnimi intervali na ledu in centrifugirali 20 min pri 4 °C in 20 000 g. Supernatant smo shranili na -80 °C.

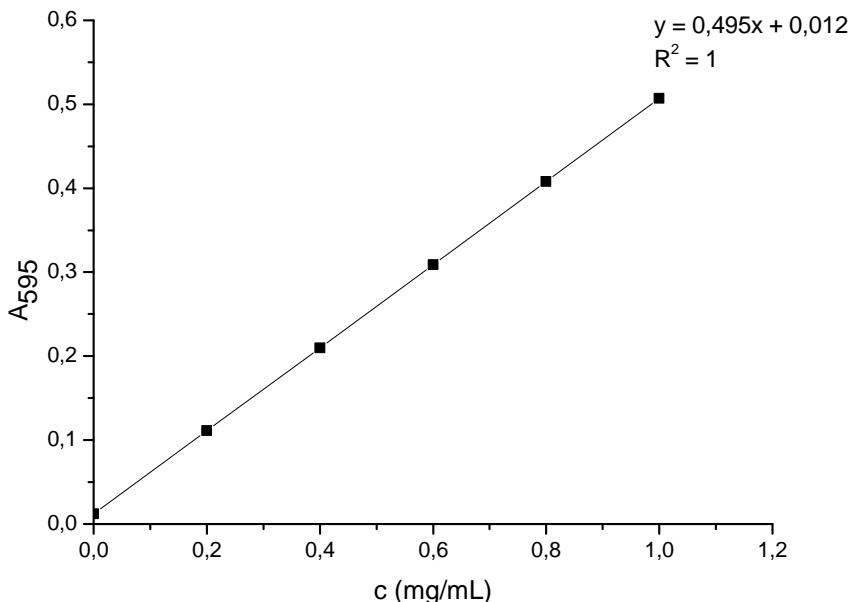
3.3.8 Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov

Po 1-urni izpostavivti celic EIP v koncentraciji 0,05 g/L oz. F2 smo odvzeli 4 x 10 mL brozge, centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min (centrifuga 322A, Tehnica). Po odstranitvi supernatanta smo sedimentu dodali 10 mL PBS (Preglednica 6), centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min (centrifuga 322A, Tehnica), dodali 10 mL PBS, združili 2 vzorca, centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min (centrifuga 322A, Tehnica) in ponovno sprali z 10 mL PBS. Na koncu smo supernatant zavrgli, sediment pa zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri -80 °C.

Vzorce zamrznjene na -80 °C smo odtajali na ledu in jim dodali 1250 µL CP, ki vsebuje 2,5 µL IP in 1,25 µL DTT. Vse skupaj smo prenesli v Eppendorf centrifugirko z ovalnim dnom, dodali 5 žličk cirkonij-kremenčevih kroglic, vrtinčili 5 x 1 min, z vmesnimi 1-minutnimi intervali na ledu in centrifugirali 20 min pri 4 °C in 800 g. Supernatant smo prenesli v novo Eppendorf centrifugirko in centrifugirali 30 min pri 4 °C in 10000 g. Dobljeni sediment smo resuspendirali v 1 mL CP, centrifugirali 10 min pri 4 °C in 10000 g in nato postopek spiranja ponovili. En sediment smo raztopili v 50 µL MP, ki vsebuje 0,1 µL IP in 0,05 µL DTT, in ga prenesli k drugemu sedimentu. Nato smo pomerili koncentracijo proteinov. Sediment smo shranili na -80 °C.

3.3.9 Merjenje koncentracije proteinov v ekstraktih

Koncentracijo proteinov v ekstraktih smo določili po metodi Bradford (Bradford, 1976) na podlagi umeritvene krivulje. Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili BSA v različnih koncentracijah: 0,02; 0,4; 0,6; 0,8 in 1 g/L. 4 µL vsake raztopine z različno koncentracijo BSA smo odpipetirali v jamico prozorne mikrotitrsko ploščice in dodali 196 µL 1x Bradfordovega reagenta. Po mešanju in 5 minutah smo izmerili absorbanco na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire 2 pri valovni dolžini 595 nm.



Slika 6: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu

V primeru vzorcev smo v jamice prozorne mikrotitrskie ploščice odpipetirali 4 µL ustreznega redčenega ekstrakta in dodali 196 µL 1x Bradfordovega reagenta. Spleti vzorec je predstavljal pufer, v katerem je bil raztopljen ekstrakt. Po mešanju in 5 minutah smo izmerili absorbanco na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire 2 pri valovni dolžini 595 nm. Vzorcem smo odšteli spleti vzorec in izračunali koncentracijo proteinov z enačbo umeritvene krivulje. Ekstrakte vzorcev smo redčili tolikokrat, da so absorbance padle v linearno območje umeritvene krivulje.

3.3.10 2-DE

Z 2-DE ločujemo proteine glede na izoelektrično točko (1. dimenzija) in molekulsko maso (2. dimenzija).

3.3.10.1 1. dimenzija

V prvi dimenziji smo ločevali proteine glede na njihovo izoelektrično točko (pI). Uporabili smo izoelektrično fokusiranje (IEF). To je elektroforetska metoda, ki se uporablja za analizo amfoternih snovi. Metoda temelji na dejstvu, da amfoterne snovi migrirajo pod vplivom električne napetosti vzdolž gradiента pH.

V našem primeru pozitivno nabiti proteini potujejo proti negativno nabiti elektrodi (katodi), negativno nabiti proteini pa potujejo proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Protein ne potuje več, ko je njegov pI enak pH medija, torej ko postane elektronevtralen. To pomeni, da je število pozitivnih nabojev enako številu negativnih nabojev. Po končani elektroforezi so amfoterne molekule ločene vzdolž pH gradiента v skladu s svojimi pI. Izoelektrično fokusiranje poteka pri visoki napetosti, zato moramo nosilec obvezno hladiti (Sepčić in sod., 1997).

- Priprava vzorca za nanos na IPG trakove

Vzorec smo zmešali z RP (Preglednica 11) tako, da smo dosegli koncentracijo proteinov $0,4 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Vsebnost proteinov v $250 \text{ } \mu\text{L}$ RP je bila tako $100 \text{ } \mu\text{g}$. V primeru totalnih proteinov smo uporabili RP s pH 4-7, za rehidracijo mitohondrijskih proteinov pa RP s pH 3-10. Vzorec smo nato vrtinčili in inkubirali na sobni temperaturi 15 min ter centrifugirali 5 min pri 13400 obr./min (centrifuga miniSpin, Eppendorf).

RP vsebuje ureo, tioureo, CHAPS in DTT. Urea in tiourea sta kaotropa in prekineta vodikove vezi in hidrofobne interakcije v proteinu. CHAPS je detergent in prekinja hidrofobne interakcije v proteinih in poveča topnost proteinov. DTT je reducent in prekinja disulfidne vezi (Görg in sod., 2007).

- Nanos vzorca na IPG trakove

Na sredino reže na plošči za rehidracijo smo nanesli $250 \text{ } \mu\text{L}$ RP z raztopljenimi proteini. Zamrznjenemu IPG traku smo odstranili plastično folijo, ki prekriva gel in trak položili z gelom navzdol v režo na vzorec.

Trak smo nato prekrili s 3 mL mineralnega olja, ploščo za rehidracijo pokrili s pokrovom in pustili, da so se trakovi čez noč rehidrirali. Mineralno olje preprečuje kristalizacijo uree in evaporacijo vode v RP.

V primeru totalnih proteinov smo uporabili IPG trak s pH 4-7, za rehidracijo mitohondrijskih proteinov pa IPG trak 3-10.

- IEF

Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ med potekom IEF, smo nanesli $4 \times$ po 1 mL mineralnega olja v vertikalnih črtah. Na to ploščo z oljem smo položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, kamor smo vlinili 10 mL mineralnega olja in vanj položili plastično ploščo z vdolbinami. IPG trak smo po rehidraciji sprali z ddH₂O. S tem smo s traku sprali kristalčke uree in proteine, ki so veliki več kot 120 kDa in ne vstopajo v gel. Trak smo popivnali na brisači in ga z gelom navzgor položili v vdolbino na plošči tako, da je bil plus konec traku, kjer je pH nižji, na anodni strani.

Odrezali smo 2 elektrodna trakova, enega omočili v ddH₂O, drugega v 2 % (w/v) DDT (za nadomeščanje DTT med potekom elektroforeze) in ju popivnali na brisači. Elektrodni trak omočen v ddH₂O smo položili na anodni (+) konec IPG traku in elektrodni trak omočen v DTT na katodni (-) konec IPG traku. Na sredino elektrodnih trakov smo vpeli elektrodi. Trakove smo prelili s 150 L mineralnega olja in pokrili s pokrovom.

IEF ploščo smo povezali z usmernikom, na katerem smo nastavili 4 faze:

1. faza: 0 - 300V, 1 min
2. faza: 300 V, 1 ura
3. faza: 300 - 3500V, 1 h 30 min
4. faza: 3500V, 5 ur

Tok teče od katode (-) proti anodi (+). Prvi dve fazi sta namenjeni temu, da iz gela izstopijo ioni.

IEF je potekalo pri 20 °C. S hlajenjem namreč vzdržujemo pH, pri čemer služi mineralno olje kot prevodnik topote.

Po IEF smo IPG trakove shranili na -80 °C do nadaljnje analize.

3.3.10.2 2. dimenzija

V drugi dimenziji smo ločevali proteine glede na njihovo molekulsko maso (MW). Uporabili smo elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS). Metoda temelji na uporabi anionskega detergenta SDS, ki denaturira proteinske molekule, jih razvije in obda s svojimi molekulami. Ker imajo molekule SDS negativen naboj, bodo imeli tudi vsi denaturirani proteini negativen naboj, velikost naboja pa bo odvisna od velikosti proteina (Sepčić in sod., 1997). SDS se namreč veže na protein povprečno v razmerju ena molekula SDS na dve aminokislini. S tem dobijo vsi proteini enotno število negativnih nabojev glede na število aminokislinskih, ki jih vsebujejo (Herzog-Velikonja in sod., 2001). V električnem polju bodo zato vsi proteini potovali proti anodi, hitrost potovanja pa bo obratnosorazmerna z njihovo velikostjo. Večje molekule bodo potovale počasneje od manjših, ker jim nosilec nudi večji upor. Tako manjše molekule prepotujejo daljšo razdaljo od katode do anode kot večje (Sepčić in sod., 1997). Ker molekule zavzamejo tudi enako paličasto obliko, postane njihova mobilnost v poliakrilamidnem gelu odvisna izključno od njihove mase (velikosti) (Križaj, 2008).

- Vlivanje gelov

Za elektroforezno ločevanje proteinov glede na molekulsko maso smo uporabili poliakrilamidne gele.

Poliakrilamidni geli nastanejo s polimerizacijo monomera akrilamida $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$ v prisotnosti manjših količin N,N,N',N'-metilenbisakrilamida oz. bisakrilamida $\text{CH}_2(\text{NHCOHC}=\text{CH}_2)_2$. Bisakrilamid sta pravzaprav dve akrilamidni molekuli, povezani z metilensko skupino in deluje kot povezovalni agens. Akrilamidni monomer polimerizira v dolge verige, v katere je občasno vgrajen bisakrilamid, ki predstavlja mesto za podaljševanje verige v novo smer. Na ta način nastane matrica precej dobro definirane strukture. Polimerizacija akrilamida je primer reakcije z radikalom. Začne se z dodatkom amonijevega persulfata (APS) in N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina (TEMED), saj TEMED katalizira razpad persulfatnega iona v radikal. Kisik zajema radikale, zato raztopino pred uporabo razplinimo (Wilson in Walker, 2000).

Med stekleni plošči smo dali na levo in desno stran distančnika. Vse skupaj smo vpeli v nosilca z vijaki. S stički smo kalup vpeli v nosilec. Med stekleni plošči smo s stekleno pipeto vlili 19 mL ločilnega gela (Preglednica 12). Na zgornjo površino gela smo z drugo stekleno pipeto nanesli tanko plast ddH₂O. Ta gelu preprečuje stik s kisikom, kar omogoča enakomerno polimerizacijo. Ko gel polimerizira, vodo odlijemo in površino gela dobro osušimo.

- Uravnoteženje IPG trakov pred SDS-PAGE

Trakove smo vzeli iz zamrzovalnika in jih 4x sprali z 1x SDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 15). Nato smo trakove prenesli v epruvete z 10 mL pufra za uravnoteženje I in dali na stresalnik za 15 minut. Iz pufra za uravnoteženje I smo jih prenesli v pufer za uravnoteženje II in jih ponovno dali na stresalnik za 15 minut. Po uravnoteženju smo trakove prenesli na filter papir.

- Prenos IPG traku na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo nalili agarozno raztopino (Preglednica 14), ki smo jo prej segreli na T = 100 °C in takoj spustili skozi trak, ki se je usedel na površino gela.

- SDS-PAGE

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup s stički vpeli v zgornjo posodo za SDS-PAGE in odstranili nosilec. Vse skupaj smo postavili v spodnjo posodo za SDS-PAGE. Obe posodi napolnimo z 1x SDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 14).

SDS-PAGE posodo smo povezali z usmernikom, na katerem smo nastavili 2 faze:

1. faza: 20 mA/gel, 15 min

2. faza: 40 mA/gel, dokler BFM ne doseže spodnjega roba gela (~1 ura 35 minut)

SDS-PAGE je potekala pri 15 °C.

Po končani SDS-PAGE smo gel vzeli iz stekel, odstranili trak in gel primerno označili.

3.3.11 Barvanje gelov

Gele smo barvali z barvilo SYPRO Ruby (Preglednica 19). Barvilo SYPRO Ruby je sestavljeno iz rutenija kot del organskega kompleksa. Barvilo omogoča metodo za zaznavanje proteinov v poliakrilamidnih gelih, ki temelji na fluorescenci. Barvilo zazna glikoproteine, proteine, ki se vežejo na Ca^{2+} , lipoproteine, fibrilarne proteine in ostale proteine, ki jih je težko obarvati. Nukleinskih kislin ne obarva (Berggren in sod., 2000). Meja detekcije za barvilo je 1-2 ng proteina na 2-D elektroforetsko liso. Intenziteta fluorescence pa je linearno odvisna od količine proteina, kar omogoča kvantitativno ovrednotenje proteina (Görg in sod., 2000). 2-D lise se nikoli ne obarvajo prekomerno (Molecular Probes, 2005). Barvilo se ne veže kovalentno na proteine, ampak se veže na aminokisline v proteinih v kislem pH. Najmočnejše interakcije ima z Lys, Arg in His ostanki in najšibkejše s Tyr in Trp (Steinberg in sod., 2000).

Preglednica 19: Postopek barvanja gelov

korak	raztopina	čas
fiksacija	fiksacijska raztopina	2x 30 min
barvanje	barvilo SYPRO Ruby	preko noči
razbarvanje	raztopina za razbarvanje	2x 30 min
izpiranje	ddH ₂ O	3x 5 min

Za en gel v posodi smo uporabili 200 mL raztopine. Če smo barvali 2 gela v isti posodi, smo uporabili 300 mL raztopine. Gele smo mešali v raztopinah na stresalni plošči.

S fiksacijo smo preprečili difuzijo proteinov in iz gela sprali odvečne ione in SDS. Vse nadaljnje postopke smo delali v temi, saj je barvilo SYPRO Ruby občutljivo na svetlobo. Banjice smo dodatno zaščitili pred svetlobo z alu folijo. Pri razbarvanju smo gele prenesli v novo posodo. Ta korak je potreben, da zmanjšamo obarvanost ozadja ter nespecifične signale.

3.3.12 Slikanje gelov

Gele smo slikali s sistemom za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR – Gbox kamera.

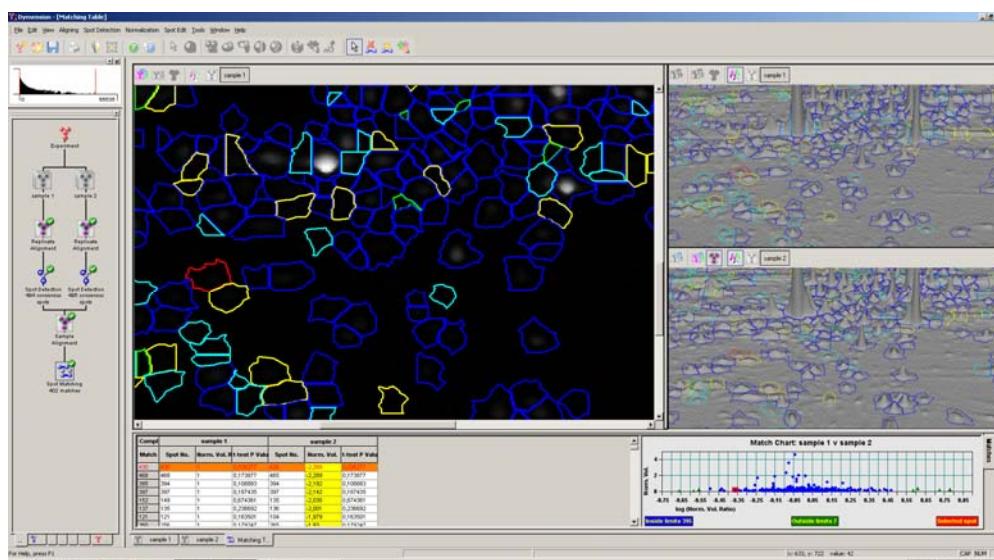
Barvilo SYPRO Ruby ima eksitacijsko valovno dolžino pri 280 nm in emisijsko valovno dolžino pri 610 nm.

Stalni parametri pri slikanju totalnih proteinov so bili zaslonka 1,2, zoom 12,5, fokus 141 in čas izpostavitve 100 ms. Stalni parametri pri slikanju mitohondrijskih proteinov so bili zaslonka 1,2, zoom 12,6, fokus 144 in čas izpostavitve 100 ms.

3.3.13 Analiza slike

Slike gelov smo analizirali v programu 2-D Dymension. S tem programom lahko med seboj primerjamo več gelov. Enega postavimo za referenčni gel, s katerim se testirani vzorci primerjajo. V našem primeru je bila kot referenčni gel vzeta kontrola.

Najprej smo na vseh slikah odstranili moteče robove gelov ter določili položaj 2-D elektroforetskih lis na posameznem gelu. Program skupne 2-D lise na vseh gelih poveže in jih primerja med seboj. Pregledali smo 2-D lise, ki jih je program avtomatsko zaznal in obkrožil in preverili, kako se vsaka posamezna 2-D lisa na kontrolnem gelu ujema z 2-D lisami na ostalih gelih. Pri pregledovanju smo si pomagali s tridimenzionalnim pogledom 2-D lis. Izražanje različnih proteinov smo ocenili iz preglednice, ki podaja normalizirane vrednosti volumnov 2-D lis glede na kontrolo.



Slika 7: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2-D Dymension

Normaliziran volumen predstavlja razmerje med volumnom ene lise proti celokupnemu volumnu vseh lis na gelu (Enačba 10).

$$V_N [\%] = \frac{V}{\sum_{i=1}^n V_i} \dots (10)$$

Z normaliziranimi volumni in razmerjem med njimi se izognemo vplivu variacij v nanosu proteinov in barvanju med posameznimi geli.

Diferencialno izražanje je značilno, če je razmerje med V_N posamezne 2-D lise tretiranega vzorca in V_N kontrole večje ali manjše od 1,5.

Diferencialno izražene proteine smo identificirali na podlagi proteinskih map kvasovke *S. cerevisiae*, predhodno pridobljenih v Laboratoriju za proteomiko (Priloga F, G).

3.3.14 Statistična analiza rezultatov

3.3.14.1 Statistična analiza antioksidativne učinkovitosti

- Povprečna vrednost

Rezultate meritev smo podali kot povprečne vrednosti vseh meritev znotraj določene metode, v skladu z enačbo (11) (Košmelj, 2001).

$$\bar{x} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) \dots (11)$$

kjer je:

\bar{x} - povprečna vrednost

n - število vzorcev

x_i - vrednosti i-te meritve

Za statistično ovrednotenje rezultatov smo uporabili računalniški program SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01. Cary, SAS Institute, Inc, 1999). Osnovne statistične parametre smo izračunali z MEANS postopkom. Podatke smo testirali za normalno porazdelitev in analizirali z GLM (splošni linearni model ang. General Linear Model).

- Standardna napaka

Za oceno variabilnosti rezultatov smo uporabili standardno napako (SEM), ki smo jo izračunali z enačbo (12) (Košmelj, 2001).

$$SEM = \frac{SD}{n} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots (12)$$

kjer je:

SEM - standardna napaka

SD - standardni odklon

x_i - vrednosti i-te meritve

n - število vzorcev

\bar{x} - povprečna vrednost

3.3.14.2 Statistična analiza spremembe proteoma

Za ugotavljanje statistično značilnih razlik v izražanju proteinov smo v programu 2-D Dymension naredili statistično analizo Student's t-test. Student's t-test je definiran kot preizkušanje domneve o razlikah med povprečjem dveh vzorcev. Pri obdelavi rezultatov smo uporabili zgornjo mejo tveganja $p < 0,05$ tako, da lahko z več kot 95 % verjetnostjo trdimo, da se povprečji obeh vzorcev statistično značilno razlikujeta (Košmelj, 2001).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 PREVERJANJE IN VIVO ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI EIP IN POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN

4.1.1 Preverjanje *in vivo* antioksidativne učinkovitosti EIP

V okviru diplomskega dela smo določili *in vivo* antioksidativno učinkovitost EIP_{DMSO}. Kot modelni organizem smo uporabili kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 2155 v stacionarni fazi rasti, v časovni točki, določeni v predhodnih poskusih, kjer je bilo fiziološko stanje kulture z vidika znotrajcelične oksidacije stabilno. Za precepljanje kulture smo uporabili trdno gojišče YEPD (Preglednica 4), za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase smo uporabili tekoče gojišče YEPD (Preglednica 5), za vzdrževanje kvasne biomase v stacionarni fazi rasti pa smo uporabili PBS pufer (Preglednica 6).

Uporabili smo 96 % EIP iz Dolenjske regije, letnik 2008, v katerem je bilo predhodno določenih 29 ± 4 g/L skupnih fenolnih spojin s spektrofotometrično Folin-Ciocalten metodo (Kuraja, 2009). Med dodajanem 96 % EIP v suspenzijo celic se je le-ta obarjal. Pri tem bi lahko izgubili del fenolnih spojin, zato smo se odločili, da suh 96 % EIP počasi raztopimo v DMSO do koncentracije skupnih fenolnih spojin 20 g/L (EIP_{DMSO}). DMSO je namreč polarna organska tekočina, ki se široko uporablja kot topilo.

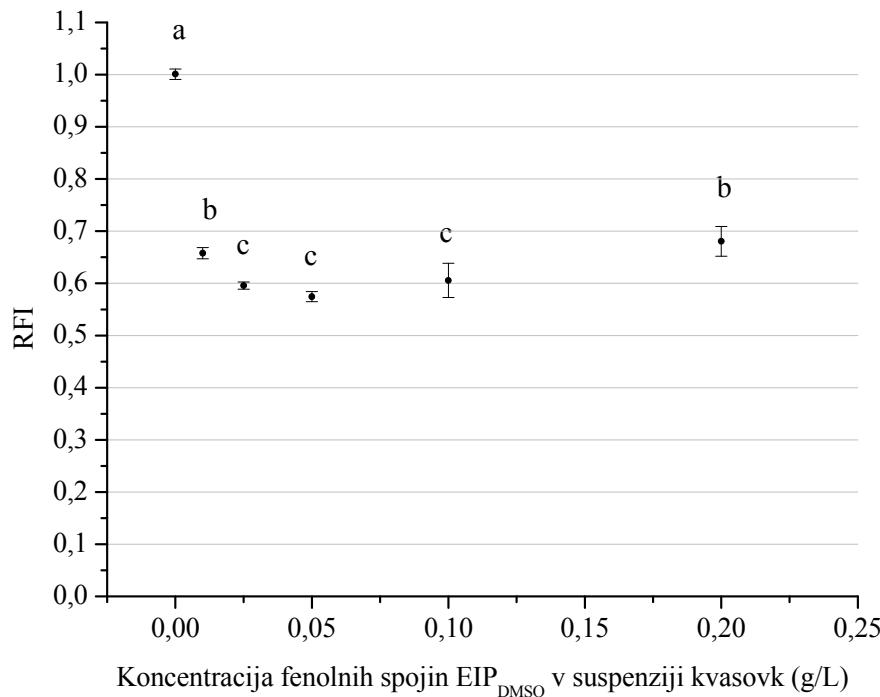
Antioksidativno učinkovitost EIP_{DMSO} v celicah smo preverili z merjenjem znotrajcelične oksidacije, ki smo jo določili z uporabo barvila H₂DCFDA (Preglednica 9). Deacetilirano barvilo H₂DCF se v prisotnosti oksidantov oksidira do fluorescentne oblike DCF (Jakubowski in Bartosz, 1997). Nižja fluorescenčna intenziteta (FI) tako pomeni nižjo znotrajcelično oksidacijo in s tem boljšo antioksidativno učinkovitost. Nasprotno, višja FI pomeni višjo znotrajcelično oksidacijo in slabšo antioksidativno učinkovitost.

Celice smo izpostavili različnim koncentracijam fenolnih spojin EIP_{DMSO} v suspenziji (0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 in 0,2 g/L). Za vsako koncentracijo smo naredili vsaj 2 biološki ponovitvi izpostavitve in 3 ponovitve merjenja FI za vsako biološko ponovitev. Meritve smo opravili tudi za kontrolo, kjer kultura *S. cerevisiae* ni bila izpostavljena fenolnim spojinam.

Preglednica 20: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP). Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti glede na kontrolo (RFI).

fenolne spojine EIP _{DMSO}						
c (g/L)	0-kontrola	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2
RFI	1,03	0,68	0,57	0,55	0,58	0,69
	0,97	0,68	0,57	0,54	0,57	0,64
	1,05	0,68	0,61	0,54	0,60	0,56
	0,99	0,65	0,60	0,54	0,76	0,75
	1,02	0,61	0,60	0,56	0,60	0,71
	0,94	0,66	0,61	0,58	0,52	0,73
	0,99			0,64		
	1,03			0,59		
	1,03			0,60		
	1,02			0,60		
	0,95			0,61		
	0,99			0,55		
povprečje RFI	1,00 ^a	0,66 ^b	0,59 ^c	0,58 ^c	0,61 ^c	0,68 ^b
±	±	±	±	±	±	±
SEM	0,010	0,011	0,007	0,010	0,033	0,028

^{a,b,c} povprečja RFI z različnimi črkami se statistično značilno ($p < 0,05$) razlikujejo



Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP), izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI). Različne črke označujejo statistično značilne ($p < 0,05$) diferencialne vrednosti.

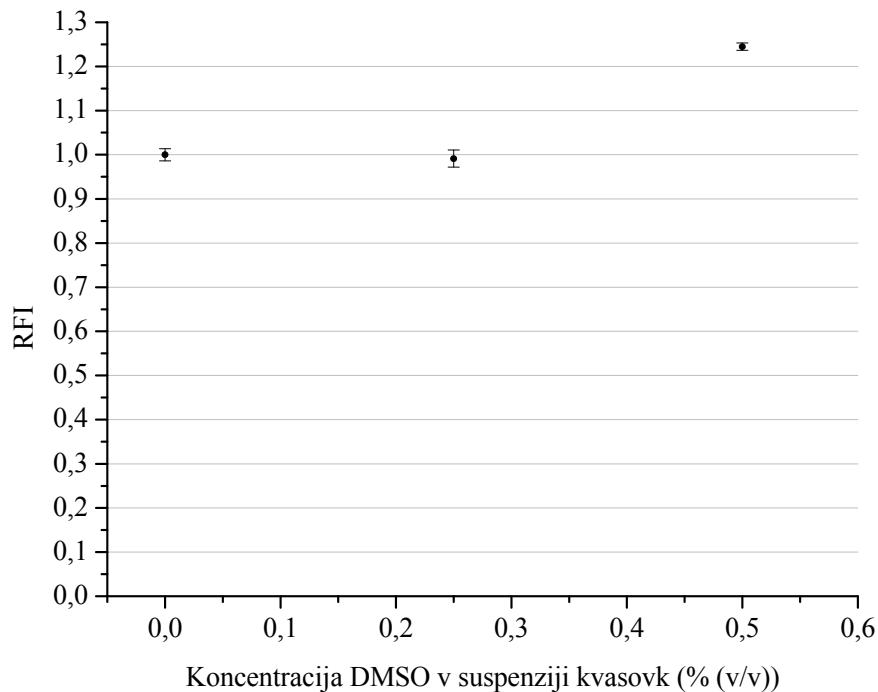
EIP_{DMSO} je znižal znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovk pri vseh testiranih koncentracijah fenolnih spojin v suspenziji (Slika 8) in je zato učinkovit antioksidant *in vivo*. Izkazalo se je, da znotrajcelična oksidacija kvasovk pada z naraščanjem koncentracije fenolnih spojin do 0,05 g/L v suspenziji celic. Antioksidativna učinkovitost se je pokazala že pri koncentraciji fenolnih spojin 0,0125 g/L v suspenziji celic, saj se je vsebnost oksidantov v celici znižala za 34 %. Najboljša antioksidativna učinkovitost EIP_{DMSO} se je pokazala pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L v suspenziji celic. Pri tej koncentraciji je bila znotrajcelična oksidacija za 42 % nižja kot pri kontroli. Pri višjih koncentracijah fenolnih spojin (0,2 g/L) v suspenziji celic se je znotrajcelična oksidacija ponovno povišala. Kljub temu je bila pri koncentraciji fenolnih spojin 0,2 g/L v suspenziji znotrajcelična oksidacija še vedno nižja od kontrole za 32 %.

Vzroka za višanje znotrajcelične oksidacije pri višjih koncentracijah fenolnih spojin v suspenziji celic sta lahko dva. Prvi je oksidativno delovanje EIP_{DMSO} pri višjih koncentracijah fenolnih spojin v suspenziji celic in drugi oksidativen učinek DMSO, v katerem smo pripravili založno raztopino EIP.

Oksidativen učinek DMSO smo preverili tako, da smo celice izpostavili različnim koncentracijam DMSO (0,25 % (v/v); 0,5 % (v/v) in 1 % (v/v)). Koncentracija DMSO 0,25 % (v/v) je ustrezala volumnu EIP_{DMSO}, ki smo ga dodali suspenziji kvasovk, da smo dobili koncentracijo fenolnih spojin 0,05 g/L, 0,5 % (v/v) DMSO je ustrezalo 0,1 g/L fenolnih spojin, 1 % (v/v) DMSO pa 0,2 g/L fenolnih spojin. Nato smo izmerili znotrajcelično oksidacijo.

Preglednica 21: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam dimetil sulfoksida (DMSO). Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti glede na kontrolo (RFI).

DMSO				
c (% (v/v))	0-kontrola	0,25	0,5	
RFI	0,98	1,03	1,24	
	1,04	1,02	1,26	
	1,00	0,95	1,22	
	0,98	0,96	1,26	
povprečje RFI	1,00	0,99	1,25	
\pm	\pm	\pm	\pm	
SEM	0,014	0,019	0,009	



Slika 9: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi različnim koncentracijam dimetil sulfoksida (DMSO), izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI).

Izkazalo se je, da DMSO pri višjih koncentracijah zvišuje znotrajcelično oksidacijo (Slika 9). Pri koncentraciji DMSO 0,25 % (v/v) v suspenziji celic se ta učinek še ne pokaže, medtem ko se pri koncentraciji DMSO 0,5 % (v/v) v suspenziji celic znotrajcelična oksidacija poviša za 25 %. Kot že rečeno, je volumen, da dosežemo koncentracijo fenolnih spojin 0,1 g/L in DMSO 0,5 % (v/v) v suspenziji enak. Pri izpostavitvi fenolnim spojinam EIP_{DMSO} s koncentracijo 0,1 g/L v suspenziji celic se je znotrajcelična oksidacija znižala za 39 %. Brez oksidativnega učinka DMSO bi se znotrajcelična oksidacija v tem primeru lahko znižala za 64 %. Pri koncentraciji DMSO 1 % (v/v) v suspenziji se FI poviša preko območja meritev (Priloga 3), zato v preglednici 9 in sliki 9 ni prikazana.

Dognali smo, da EIP_{DMSO} pri višjih koncentracijah kaže slabšo antioksidativno učinkovitost zaradi oksidativnega učinka DMSO in ovrgli razmišljanje, da bi bil temu vzrok oksidativno delovanje EIP_{DMSO} pri višjih koncentracijah fenolnih spojin v suspenziji celic. Zato ima pri antioksidativni učinkovitosti pomembno vlogo tudi topilo, v katerem je raztopljen propolis, ki ga dodajamo celicam in je zelo pomembno, da izberemo pravo topilo.

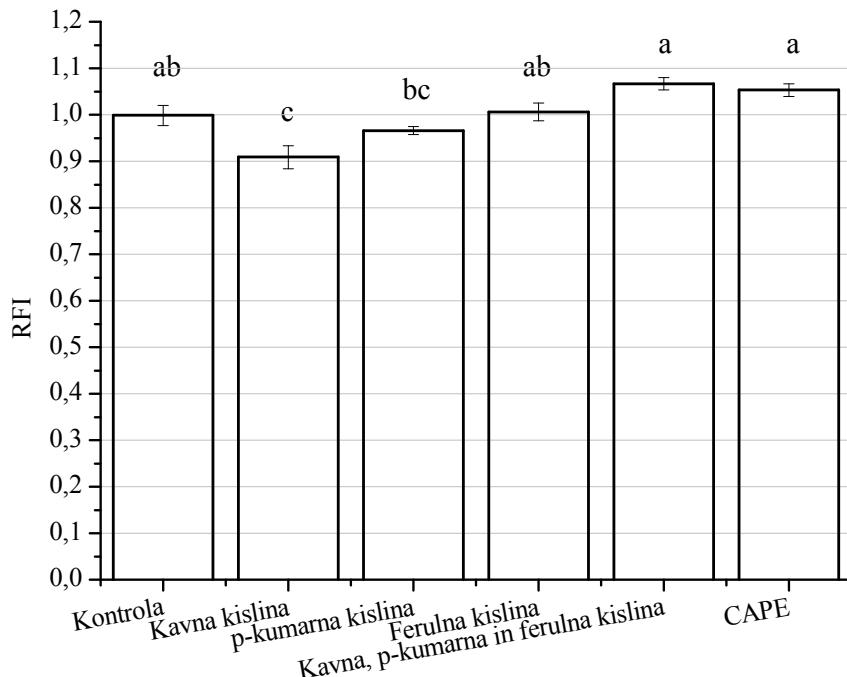
4.1.2 Preverjanje *in vivo* antioksidativne učinkovitosti posameznih fenolnih spojin

Zanimala nas je tudi *in vivo* antioksidativna učinkovitost posameznih fenolnih spojin, in sicer hidroksicimetnih kislin (kavna kislina, ferulna kislina, *p*-kumarna kislina) in estra kavne kisline CAPE. Predhodne študije na osnovi HPLC analize so namreč pokazale njihovo visoko vsebnost v propolisu (Preglednica 3). Suspenziji celic smo jih dodali (posamezne ali v kombinaciji treh) v koncentraciji 0,05 g/L. Za to koncentracijo smo se odločili, ker se je tukaj pokazala najboljša antioksidativna učinkovitost EIP_{DMSO} in DMSO še ni kazal oksidativnega učinka. Izpostavitev celic posameznim fenolnim spojinam je bila izvedena v 2 bioloških ponovitvah. Meritve smo opravili tudi za kontrolo, kjer kultura *S. cerevisiae* ni bila izpostavljena fenolnim spojinam.

Preglednica 22: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitevi posameznih fenolnih spojin in kombinacije fenolnih spojin v koncentraciji 0,05 g/L. Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti glede na kontrolo (RFI).

		kavna kislina	p-kumarna kislina	ferulna kislina
c (g/L)	0-kontrola	0,05		
RFI	1,03	0,92	0,96	0,95
	1,03	0,98	0,95	0,98
	1,03	0,98	1	1,02
	0,94	0,83	0,98	1,06
	0,98	0,88	0,97	1,03
	0,99	0,87	0,94	/
povprečje RFI	1,00 ^{ab}	0,91 ^c	0,97 ^{bc}	1,01 ^{ab}
±	±	±	±	±
SEM	0,02	0,03	0,01	0,02
kombinacija kavne, p-kumarne in ferulne kisline				
c (g/L)	0-kontrola	0,05		
RFI	1,03	1,04		
	1,08	1,05		
	1,01	1,12		
	0,92	1,09		
	1,09	1,05		
	0,86	1,05		
povprečje RFI	1,00 ^{ab}	1,07 ^a		
±	±	±		
SEM	0,04	0,01		
CAPE				
c (g/L)	0-kontrola	0,05		
RFI	0,78	1,01		
	0,92	1,06		
	0,95	1,02		
	1,11	1,07		
	1,13	1,1		
	1,1	1,06		
povprečje RFI	1,00 ^{ab}	1,05 ^a		
±	±	±		
SEM	0,06	0,01		

^{a,b,c} povprečja RFI z različnimi črkami se statistično značilno ($p < 0,05$) razlikujejo



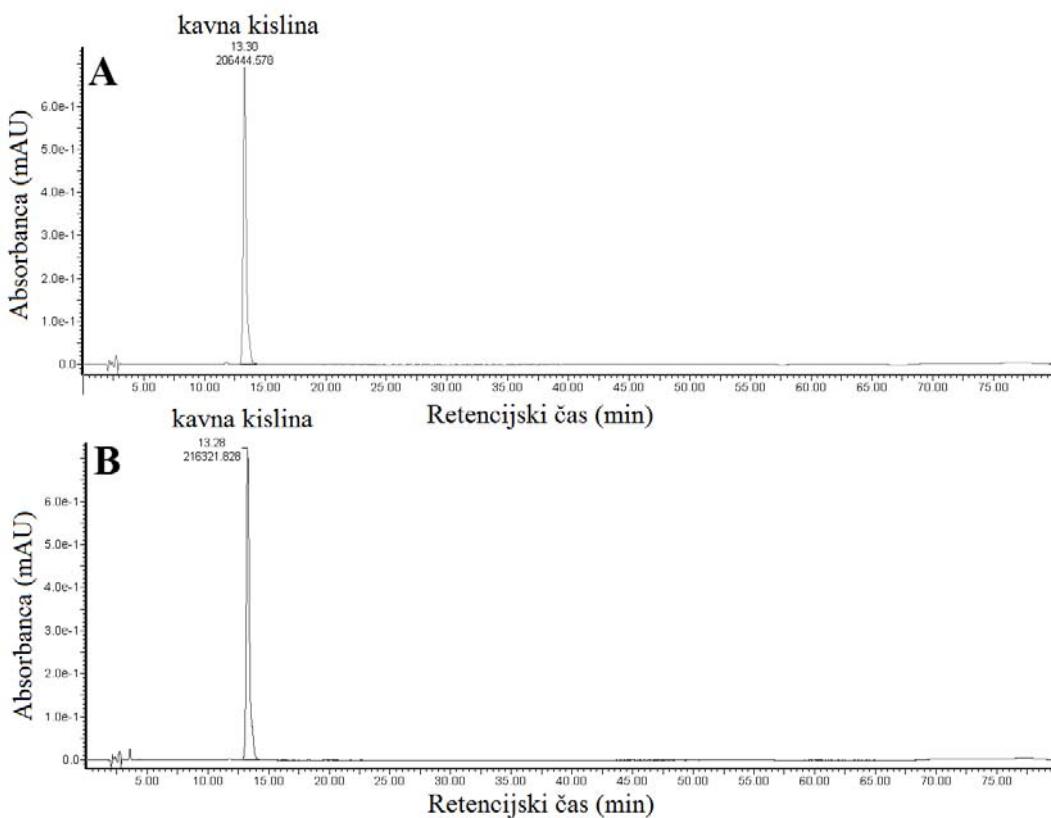
Slika 10: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi posameznim fenolnim spojinam in kombinaciji fenolnih spojin v koncentraciji 0,05 g/L glede na kontrolo, izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI). Različne črke označujejo statistično značilne ($p < 0,05$) diferencialne vrednosti.

Izmed vseh testiranih fenolnih spojin se je edino pri kavni kislini pokazala *in vivo* antioksidativna učinkovitost, znotrajcelična oksidacija se je znižala za 9 % v primerjavi s kontrolo. Pri ostalih spojinah (dodane posamezno ali v kombinaciji) sprememb znotrajcelične oksidacije ni bila statistično značilna (Slika 10). V literaturi navajajo sposobnost lovljenja prostih radikalov in inhibicije lipidne peroksidacije v smeri CAPE → kavna kislina → ferulna kislina → *p*-kumarna kislina (Kumazawa in sod., 2004; Chen, 1997; Castelluccio in sod., 1995). Vendar je potrebno poudariti, da se omenjeni podatki navezujejo na poskuse *in vitro*.

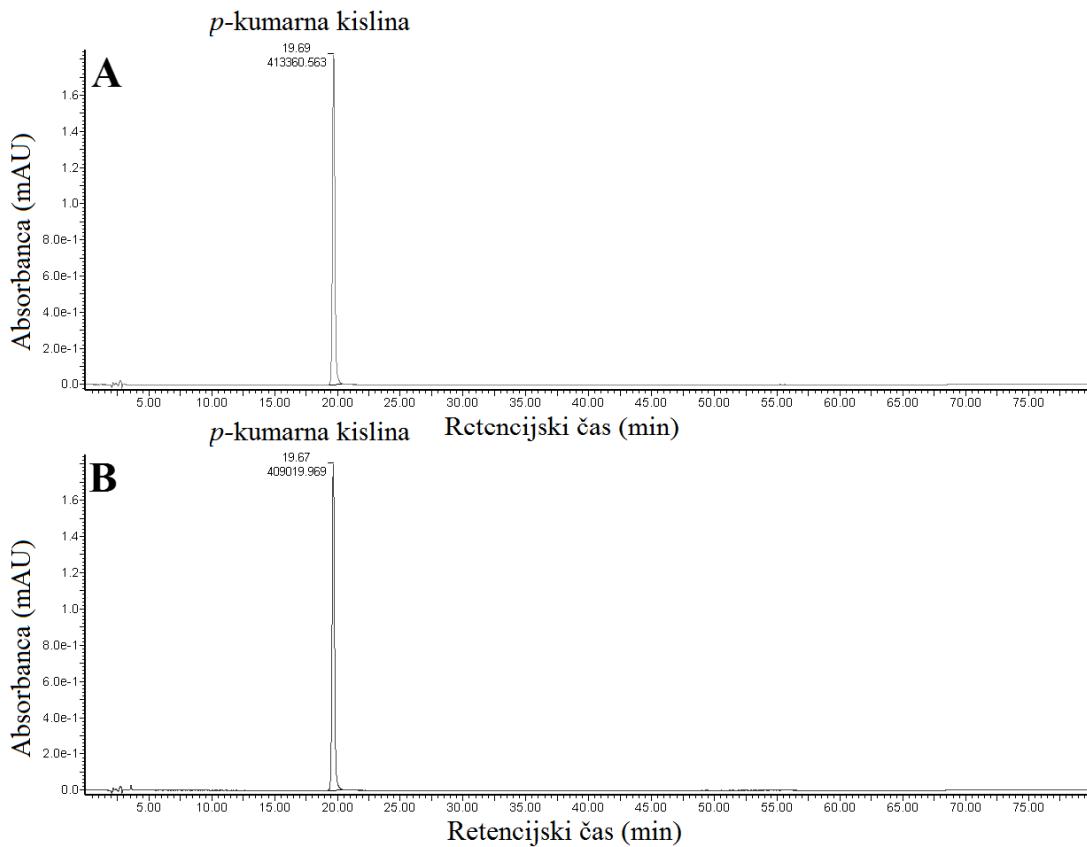
4.2 PREVERJANJE CELIČNEGA PRIVZEMA POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN IN EIP Z LC-MS

4.2.1 Preverjanje celičnega privzema posameznih fenolnih spojin z LC-MS

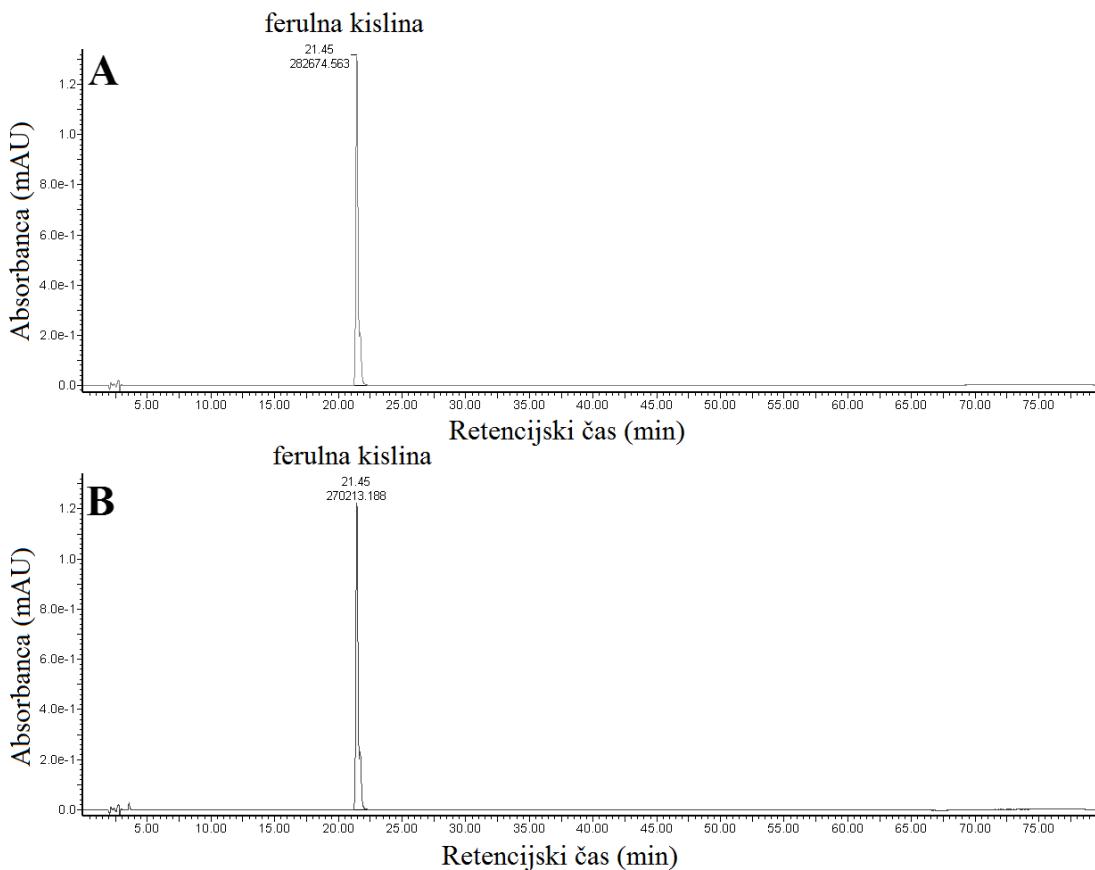
Glede na to, da testirane fenolne spojine, z izjemo kavne kisline, niso pokazale antioksidativne učinkovitosti v celicah (Slika 10), smo se vprašali, če je mogoče vzrok v tem, da spojine ne vstopijo v celice in tako posledično ne uspejo znižati znotrajcelične oksidacije. Z LC-UV-MS smo analizirali profil fenolnih spojin pred in po izpostavitvi celic kvasovk posameznim fenolnim spojinam v koncentraciji 0,05 g/L v suspenziji in tako preverili njihov celični privzem. Gafe smo izrisali pri valovni dolžini 300 nm.



Slika 11: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi kavni kislini v koncentraciji 0,05 g/L

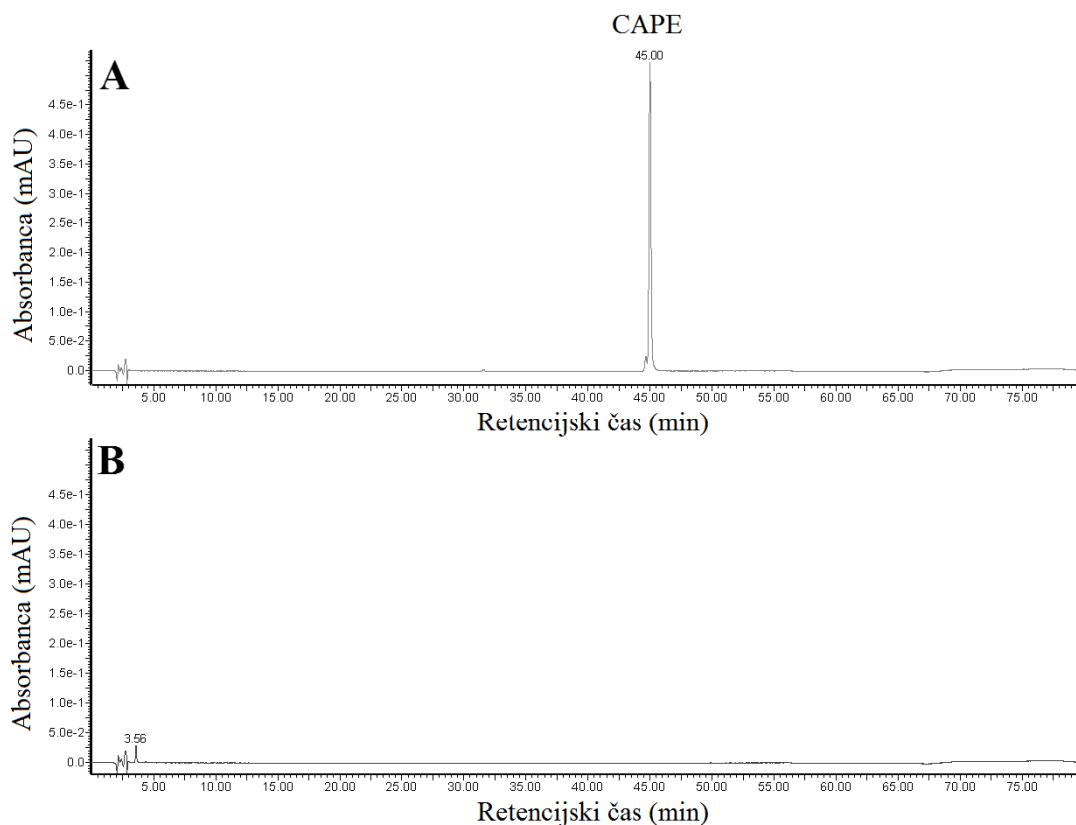


Slika 12: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* A - pred 1-urno izpostavljivjo in B - po 1-urni izpostavljivti *p*-kumarni kislini v koncentraciji 0,05 g/L



Slika 13: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi ferulni kislini v koncentraciji 0,05 g/L

Po rezultatih sodeč, nobena od hidroksicimetnih kislin ni vstopila v celico (Slika 11, 12 in 13). S tem bi lahko pojasnili vzrok, zakaj *p*-kumarna in ferulna kislina ne posredujejo antioksidativne učinkovitosti *in vivo*. Zanimivo pa kavna kislina rahlo zniža znotrajcelično oksidacijo (9 % v primerjavi s kontrolo), čeprav ne vstopa v celico.

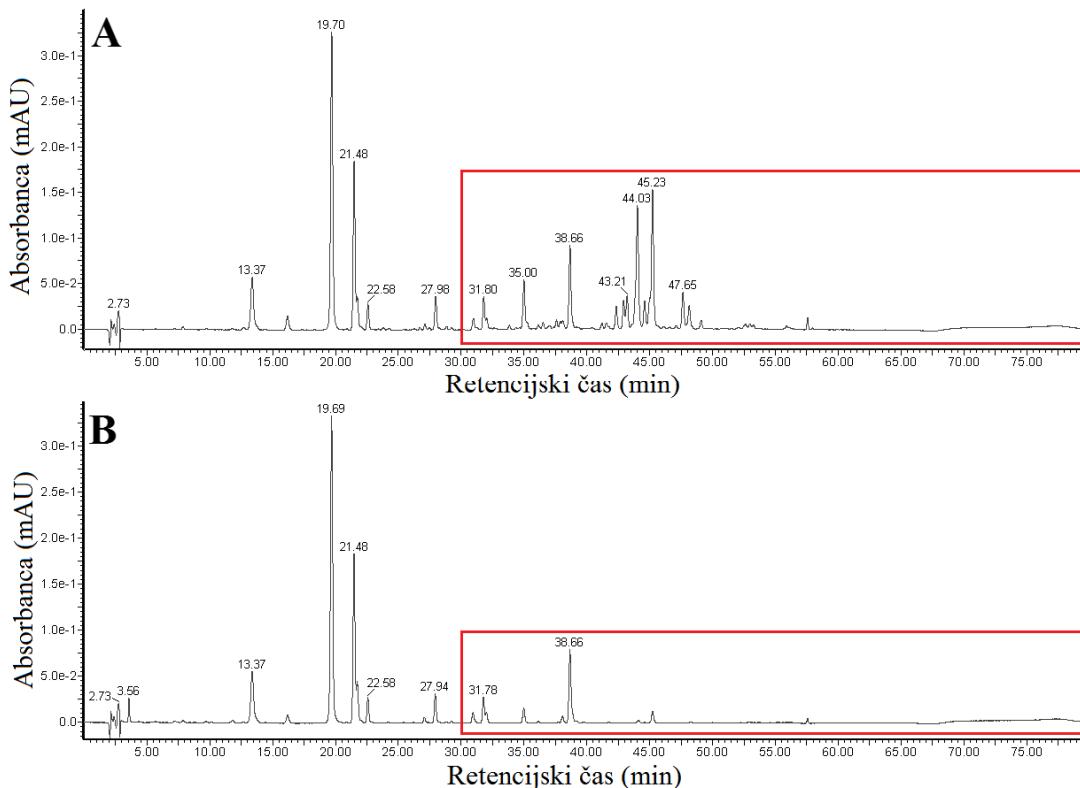


Slika 14: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi CAPE v koncentraciji 0,05 g/L

S slike 14 je razviden celični privzem spojine CAPE. Glede na to, da ni znižal znotrajcelične oksidacije (Slika 10), obstaja možnost, da je ostal na/v celični membrani ali pa je vstopil v celico, a je njegova antioksidativna učinkovitost odvisna od sinergizma drugih spojin.

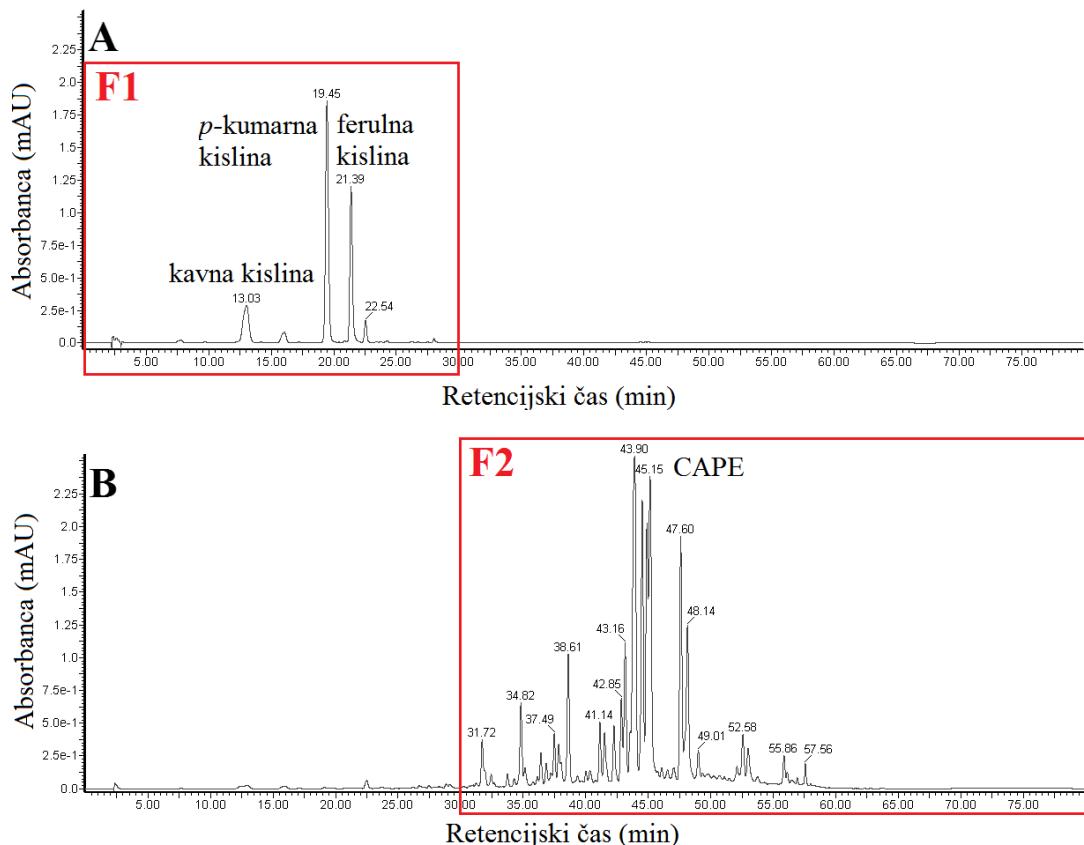
4.2.2 Preverjanje celičnega privzema EIP z LC-MS

Preverili smo tudi celični privzem celotnega EIP_{DMSO}.



Slika 15: Profil fenolnih spojin v suspenziji kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* A - pred 1-urno izpostavitvijo in B - po 1-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP)

S slike 15 je razviden privzem dela EIP_{DMSO} v celico. Spojine, ki imajo nepolarni značaj, imajo daljši retencijski čas in se kasneje izločijo iz kolone kot polarne spojine, ki imajo krajši retencijski čas. Predvsem so zanimive spojine, ki se eluirajo po 30 minutah. S SPE smo ločili fenolne spojine v 96 % EIP na dve frakciji glede na polarnost, bolj polarno frakcijo (F1, retencijski čas < 30 min) in bolj nepolarno frakcijo (F2, retencijski čas > 30 min) (Slika 16). V nadaljevanju smo preverili antioksidativno učinkovitost frakcije propolisa, ki je vstopila v celico (F2) in ga primerjali s frakcijo, ki ni vstopila v celico (F1).



Slika 16: S SPE ločene fenolne spojine etanolnega izvlečka propolisa (EIP) v dve frakciji glede na polarnost, A - bolj polarna frakcija (F1, retencijski čas < 30 min) in B - bolj nepolarna frakcija (F2, retencijski čas > 30 min)

4.3 DOLOČANJE *IN VIVO* ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI DVEH FRAKCIJ EIP

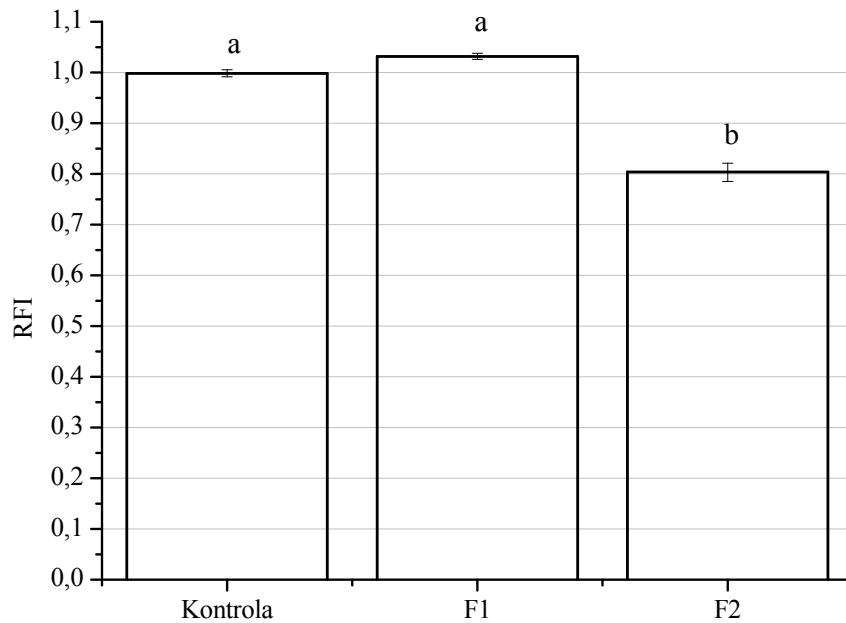
Celice kvasovk smo izpostavili obema frakcijama EIP (F1 in F2) in izmerili znotrajcelično oksidacijo. Suspenziji kvasovk smo frakciji dodali tako, da sta imeli ekvivalentno učinkovitost izpostavitve kot EIP_{DMSO} v koncentraciji 0,05 g/L v suspenziji celic.

Preglednica 23: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi frakciji F1 in F2. Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti glede na kontrolo (RFI).

		F1	F2
c (g/L)	0-kontrola	*	*
RFI	1,02	1,02	0,78
	1,00	1,02	0,85
	1,01	1,03	0,86
	0,97	1,03	0,77
	1,00	1,06	0,81
	0,99	1,03	0,75
povprečje RFI	1,00 ^a	1,03 ^a	0,80 ^b
±	±	±	±
SEM	0,007	0,006	0,018

^{a,b,c} povprečja RFI z različnimi črkami se statistično značilno ($p < 0,05$) razlikujejo

*ekvivalentna konc. fenolnih spojin v EIP (0,05 g/L)



Slika 17: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi frakciji F1 in F2 glede na kontrolo, izražena kot relativna fluorescenčna intenziteta (RFI). Različne črke označujejo statistično značilne ($p < 0,05$) diferencialne vrednosti.

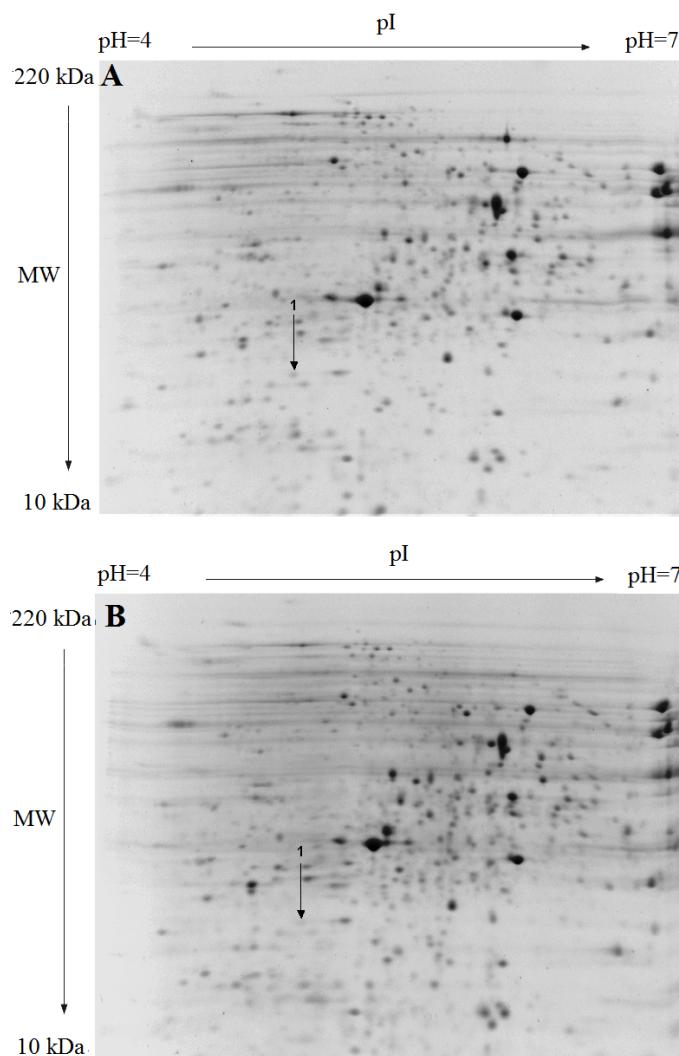
V skladu s pričakovanji je frakcija F2 pokazala *in vivo* antioksidativno učinkovitost v primerjavi z frakcijo F1. Znotrajcelična oksidacija se je znižala za 20 % glede na kontrolo (Slika 17). Če primerjamo celoten EIP_{DMSO} (Slika 8) in frakcijo F2 (Slika 17) opazimo, da ima celoten EIP_{DMSO} boljšo antioksidativno učinkovitost za 20 %. Vzrok za slabšo antioksidativno učinkovitost frakcije F2 je lahko sinergističen učinek frakcij F1 in F2. Lahko, da je v frakciji F1 prisotna spojina, ki pripomore k boljšemu antioksidativnemu delovanju učinkovine v frakciji F2, sama pa te učinkovitosti nima. Vsekakor pa je potrebno upoštevati, da se pri ekstrakciji na trdni fazni del spojin lahko izgubi.

Antioksidativno učinkovitost frakcije F2 bi lahko pripisali naslednjim spojinam: rutin, elanginska kislina, miricetin, luteonin, kvercetin, formononetin, benzilni ester kavne kisline, pinobanksin, apigenin, kamferil, izoprenilni ester kavne kisline, pinobanksin-3-*O*-acetat, kamferid, krizin, pinocembrin, galangin in cinamilni ester kavne kisline, katerih prisotnost v propolisu je bila potrjena (Preglednica 3) in se nahajajo v frakciji F2 (Slika 16). Večina teh spojin je flavonoidov. Ti delujejo kot antioksidanti tako, da lovijo radikale, kelirajo kovinske ione in inhibirajo vir superoksidnih anionov ksantin oksidazo (Bors in sod., 1996). Zavedati pa se moramo, da so v frakciji F2 tudi fenolne in fenolnim podobne spojine, ki še niso bile identificirane, zato bi bila potrebna nadaljnja analiza.

4.4 PRIMERJAVA PROTEINSKIH PROFILOV CELIC KVASOVK *S. cerevisiae* PRED IN PO IZPOSTAVITVI EIP IN F2

4.4.1 Vpliv EIP na raven totalnih proteinov

Po 1-urni izpostavitvi kvasovk *S. cerevisiae* EIP_{DMSO} s koncentracijo fenolnih spojin 0,05 g/L v suspenziji celic smo iz celic ekstrahirali totalne proteine. Proteine smo ločili z 2-DE v območju MW 10-220 kDa in pl 4-7 in gele barvali z barvilom SYPRO Ruby. Proteinske profile vzorcev po izpostavitvi EIP_{DMSO} smo primerjali glede na kontrolo, z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Naredili smo dve biološki ponovitvi in za analizo statističnih razlik v ravni proteinov uporabili statistično analizo Student's t-test ($p < 0,05$).



Slika 18: Proteinski profil celičnega ekstrakta kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (A - kontrola, B - 1-urna izpostavitev etanolnemu izvlečku propolisa v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L)

Preglednica 24: Prikaz ravni totalnih proteinov pri vzorcih kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L glede na kontrolo

št. 2-D lise	zvišanje (+)/znižanje (-) ravni proteina ^a	R ^b	p ^c	identifikacija ^d
1	-	2,289	0,026	/

^a zvišanje (+) oz. znižanje (-) ravni proteina glede na kontrolo

^b R - razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension

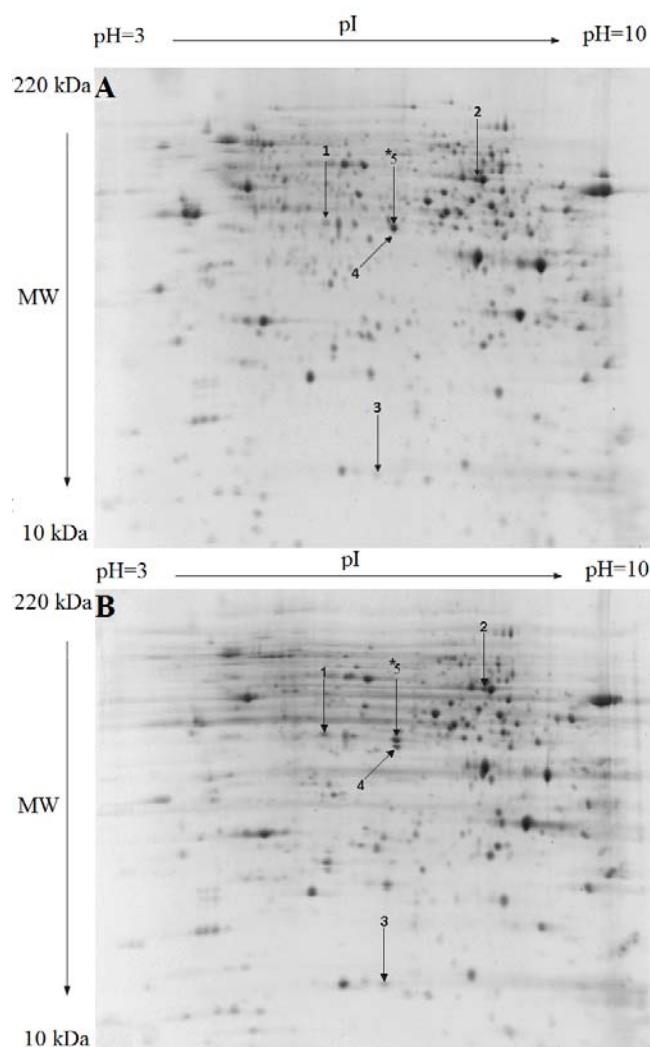
^c Student's t-test je bil izveden za preveritev statistične značilnosti diferencialne ravni proteina glede na kontrolo

^d identifikacija 2-D lis na podlagi proteinske mape (totalni proteini) kvasovke *S. cerevisiae* predhodno izdelane v Laboratoriju za proteomiko (Priloga F)

Po 1-urni izpostavitvi celic EIP_{DMSO} ni prišlo do izrazite spremembe proteinskega profila glede na kontrolo (Slika 18). Opazili smo znižano raven enega proteina, ki pa ga na podlagi proteinske mape (Priloga F) nismo uspeli identificirati.

4.4.2 Vpliv EIP in frakcije F2 na raven mitohondrijskih proteinov

Po 1-urni izpostavitvi kvasovk *S. cerevisiae* EIP_{DMSO} s koncentracijo fenolnih spojin 0,05 g/L v suspenziji celic ali frakciji F2 smo iz njih ekstrahirali mitohondrijske proteine. Proteine smo ločili z 2-DE v območju MW 10-220 kDa in pI 3-10 in gele barvali z barvilkom SYPRO Ruby. Proteinske profile vzorcev po izpostavitvi EIP_{DMSO} in frakciji F2 smo primerjali glede na kontrolo, z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Naredili smo dve biološki ponovitvi in za analizo statističnih razlik v ravni proteinov uporabili statistično analizo Student's t-test ($p < 0,05$).



Slika 19: Proteinski profil mitochondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (A - kontrola, B - 1-urna izpostavitev etanolnemu izvlečku propolisa v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L). 2-D lise, ki so označene s puščicami, nakazujejo diferencialno izražene proteine. * 2-D lisa 5 je bila vzeta kot markerski protein.

Preglednica 25: Prikaz ravni mitohondrijskih proteinov pri vzorcih kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi EIP v koncentraciji fenolnih spojin 0,05 g/L glede na kontrolo

št. 2-D lise	zvišanje (+)/znižanje (-) ravni proteina ^a	R ^b	p ^c	identifikacija ^d
1	+	1,559	0,033	Qcr2
2	-	1,547	0,022	Atp1
3	+	1,712	0,029	/
4	+	/	/	Qcr2 ^e

^a zvišanje (+) oz. znižanje (-) ravni proteina glede na kontrolo

^b R - razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension

^c Student's t-test je bil izveden za preveritev statistične značilnosti diferencialne ravni proteina glede na kontrolo

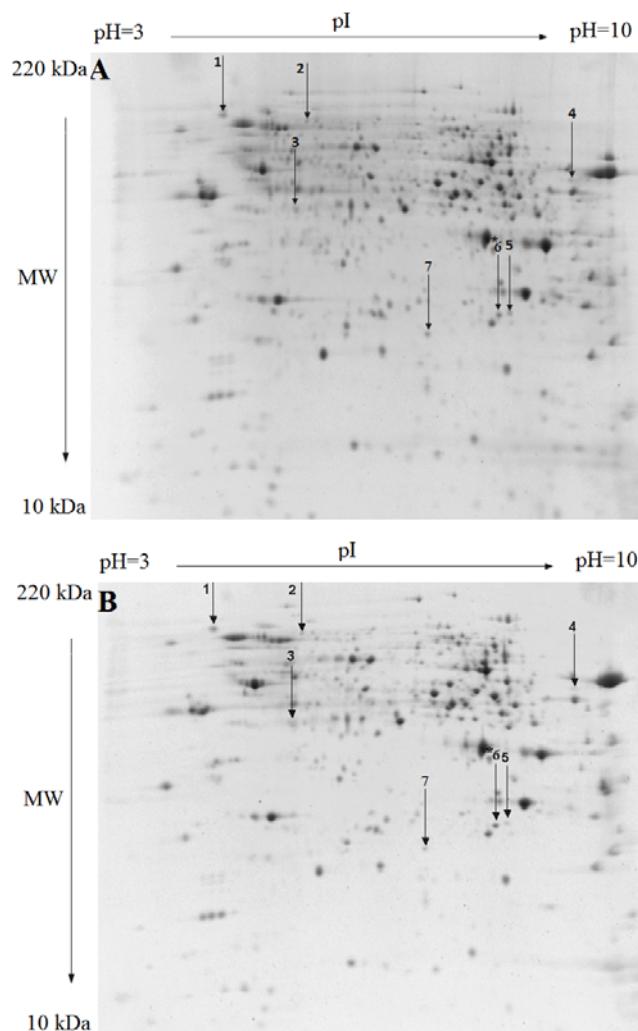
^d identifikacija 2-D lis na podlagi proteinske mape (totalni proteini) kvasovke *S. cerevisiae* predhodno izdelane v Laboratoriju za proteomiko (Priloga G)

^e najverjetnejša identiteta proteina

Na podlagi proteinske mape (Priloga G) smo ugotovili, da 2-D lisa 1 verjetno predstavlja podenoto 2 ubikinol citokrom c reduktaze (Qcr2). Ubikinol citokrom c reduktaza je komponenta elektronske transportne verige v mitohondrijski notranji membrani (NCBI, 2010b). Navedeni protein ima zvišano raven glede na kontrolo.

Pri 2-D lisi 2 smo opazili znižano raven glede na kontrolo. Na podlagi proteinske mape (Priloga G) smo ugotovili, da 2-D lisa verjetno predstavlja α podenoto F1 dela mitohondrialne F0F1 ATP sintaze (Atp1). F0F1 ATPaza je prisotna v notranji membrani mitohondrijev in sintetizira ATP. Encim je sestavljen iz dveh enot: F1 in F0. Raziskave so pokazale, da je F0F1 ATPaza pogosto tarčno mesto za delovanje številnih polifenolnih spojin. Nekatere polifenolne spojine inhibirajo F0F1 ATPazno aktivnost tako, da vplivajo na F1 (Zheng in Ramirez, 2000). V primeru vezave polifenolov na omenjeni protein, bi to lahko povzročilo premik 2-D lise 2 na gelu, kar bi zasledili kot znižano raven omenjenega proteina. Po drugi strani prisotnost eksogenih antioksidantov (v našem primeru EIP) lahko vodi do manjše potrebe celice po energiji, ki se normalno koristi za sintezo endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov oz. vzdrževanje redoks homeostaze. Podobno so Jamnik in sod. (2007) v celicah kvasovke *S. cerevisiae* po izpostavitvi matičnemu mlečku, opazili nižjo raven ATP in obenem nižjo raven Cu/Zn SOD.

2-D liso 3 z zvišano ravnjo glede na kontrolo, nam na podlagi proteinske mape (Priloga G), ni uspelo identificirati. 2-D lise 4 pri kontroli nismo zaznali. Lahko, da je protein 2-D lise 4 modifikacija proteina 2-D lise 5, ki je doprinesla k spremembji molekulske mase in posledično prestavitev na gelu. 2-D lisa 5 je bila predhodno identificirana kot Qcr2.



Slika 20: Proteinski profil mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (A - kontrola, B - 1-urna izpostavitev frakciji F2). 2-D lise, ki so označene s puščicami, nakazujejo diferencialno izražene proteine. * 2-D lisa 6 je bila vzeta kot markerski protein.

Preglednica 26: Prikaz ravni mitohondrijskih proteinov pri vzorcih kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi frakciji F2 glede na kontrolo

št. 2-D lise	zvišanje (+)/znižanje (-) ravni proteina ^a	R ^b	p ^c	identifikacija ^d
1	+	1,845	0,013	/
2	-	1,768	0,042	/
3	+	2,148	0,0040	/
4	-	2,101	0,034	/
5	-	1,740	0,026	<i>PrxI</i> ^e
7	-	1,784	0,096 ^f	Mn SOD

^a zvišanje (+) oz. znižanje (-) ravni proteina glede na kontrolo

^b R - razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension

^c Student's t-test je bil izveden za preveritev statistične značilnosti diferencialne ravni proteina glede na kontrolo

^d identifikacija 2-D lis na podlagi proteinske mape (mitohondrijski proteini) kvasovke *S. cerevisiae* predhodno izdelane v Laboratoriju za proteomiko (Priloga G)

^e najverjetnejša identiteta proteina

^f statistično neznačilna diferencialna raven proteina glede na kontrolo ($p > 0,05$)

Po 1-urni izpostavitvi kvasovke *S. cerevisiae* frakciji F2 smo v območju MW 10-220 kDa in pI 3-10 zaznali 5 2-D lis s spremenjeno ravnjo glede na kontrolo (Slika 20). Pri identifikaciji le teh smo si pomagali s proteinsko mapo (Priloga G) in ugotovili sledeče: 2-D lisa 5 z znižano ravnjo glede na kontrolo, bi bila lahko izoprotein 2-D lise 6, kateri se je spremenila pI zaradi modifikacije, npr. fosforilacije (Rabilloud in sod., 2005). 2-D lisa 6 je bila predhodno identificirana kot peroksiredoksin (Prx1) (Priloga G). Slednji ima tioredoksin peroksidazno aktivnost in igra vlogo pri redukciji vodikovih peroksidov (NCBI, 2010b). Preverili smo tudi 2-D liso 7, ki označuje Mn SOD (Priloga G), kjer je bila opažena znižana raven v primerjavi s kontrolo ($R = -1,784$, $p = 0,096$). Na podlagi proteinske mape (Priloga G), ostalih proteinov z diferencialno ravnjo glede na kontrolo, nismo uspeli identificirati.

Medtem ko smo pri proteinskemu profilu celičnega ekstrakta kvasovke *S. cerevisiae* po 1-urni izpostavitevi EIP_{DMSO} opazili le manjše spremembe v območju MW 10-220 kDa in pI 4-7 (1 diferencialno izražen protein), se je več sprememb pokazalo pri proteinskemu profilu mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke *S. cerevisiae* po 1-urni izpostavitevi EIP_{DMSO} (4 diferencialno izraženi proteini) ali frakciji F2 (6 diferencialno izraženih proteinov) v območju MW 10-220 kDa in pI 3-10 (Preglednica 24, 25, in 26).

Glavni vir ROS v celicah kvasovk je prav dihalna veriga v mitohondrijih (Costa in Moradas-Ferreira in sod., 2001), kjer nastaja največ superoksidnega aniona (Santoro in Thiele, 1997). Ob tem podatku ni presenetljivo, da bi se prve spremembe na proteinskem profilu pokazale prav v mitohondrijih. Ob vnosu eksogenih antioksidantov v EIP_{DMSO} (Slika 18 in 19) ali frakciji F2 (Slika 20) smo pričakovali znižano raven antioksidativnih obrambnih sistemov, kot so npr. superoksid dismutaza, katalaza in glutation peroksidaza. Delno smo to potrdili, in sicer smo opazili znižanje ravni proteinov Mn SOD in peroksiredoksin (Preglednica 26) v primeru izpostavitve frakciji F2. To je verjetno posledica znižane znotrajcelične oksidacije (Slika 17). Znižana raven endogenih antioksidativnih proteinov in znižana znotrajcelična oksidacija nakazujeta, da frakcija F2 verjetno deluje direktno kot lovilec radikalov in ne indirektno kot prooksidant, kar bi pomenilo znižanje znotrajcelične oksidacije ob povečani ravni endogenih antioksidativnih proteinov (Vertuani in sod., 2004). Podobno so Jamnik in sod. (2007) pokazali znižanje ravni Cu/Zn SOD pri kvasovki *S. cerevisiae* po dodatku matičnega mlečka, ki je tudi znižal znotrajcelično oksidacijo v celici. Znižana raven endogenih antioksidativnih proteinov nakazuje na manjšo potrebo celice po energiji, ki je potrebna za vzdrževanje in posledično nižjo raven proteinov, ki sodelujejo pri sintezi ATP (npr. Atp1).

Predpostavljam, da bi do večjega upada endogenih antioksidativnih proteinov ob vnosu eksogenih antioksidantov prišlo, prvič, če bi podaljšali izpostavitev eksogenim antioksidantom. V tem primeru bi se v kvasovki odstranili že prisotni antioksidativni蛋白, novi pa se ne bi več sintetizirali, saj zaradi eksogenih antioksidantov ne bi bilo potrebe po endogenih. Ali drugič, če bi kvasovko izpostavili oksidativnemu stresu. Tako bi se koncentracija ROS v celici povečala in bi kvasovka s prisotnimi eksogenimi antioksidanti sintetizirala manj novih antioksidativnih encimov, kot kvasovka brez eksogenih antioksidantov.

Z obstoječo raziskavo smo zastavljene hipoteze uspešno potrdili.

5 SKLEPI

Potrdili smo, da:

- ima etanolni izvleček propolisa antioksidativno učinkovitost *in vivo*, ki narašča s koncentracijo fenolnih spojin, in sicer do 0,05 g/L,
- testirane posamezne fenolne spojine in kombinacija le teh niso pokazale antioksidativne učinkovitosti v celici, izjema je bila kavna kislina,
- je antioksidativna učinkovitost izvlečka propolisa rezultat delovanja le bolj nepolarnih fenolnih spojin, ki vstopijo v celice in zmanjšajo znotrajcelično oksidacijo,
- vpliv propolisa kot eksogenega antioksidanta se na totalnem celičnem proteomu odraža minimalno, na ravni mitohondrijskega proteoma pa so bile spremembe bolj izrazite, in sicer v okviru antioksidativnih proteinov in proteinov vključenih v sintezo ATP.

6 POVZETEK

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so reaktivne molekule in radikali, ki nastanejo iz molekularnega kisika. Nastajajo v normalnih celičnih metabolnih procesih in ob izpostavitvi zunanjim virom oksidacije. V določenih pogojih lahko presežejo običajno koncentracijo in to se kaže kot oksidativni stres. Lahko oksidirajo DNA, lipide in proteine, kopičenje oksidiranih molekul v celicah pa je povezano s staranjem in celično smrtjo. Aerobno živeči organizmi so razvili vrsto endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov pred ROS. Medtem ko endogene antioksidante tvori naš organizem, pa lahko antioksidativnemu obrambnemu sistemu pomagamo z vnosom eksogenih antioksidantov iz živil in prehranskih dopolnil. Eden od takih je propolis, za katerega je znano, da ima antioksidativno učinkovitost *in vitro*.

V okviru diplomskega dela smo preverili *in vivo* antioksidativno učinkovitost 96 % etanolnega izvlečka propolisa (96 % EIP) slovenskega porekla. Kot modelni organizem smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 v stacionarni fazи rasti, ki smo jo inkubirali v PBS pufru pri 28 °C in 220 obr./min. Suspenziji celic smo dodali EIP v naslednjih koncentracijah fenolnih spojin: 0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 in 0,2 g/L. Po 1-urni izpostavitvi smo izmerili znotrajcelično oksidacijo z uporabo barvila 2',7'-diklorofluorescein diacetat. Izkazalo se je, da znotrajcelična oksidacija kvasovk pada z naraščanjem koncentracije fenolnih spojin, in sicer do 0,05 g/L. V nadaljevanju smo preverili antioksidativno učinkovitost posameznih fenolnih spojin, ki se v propolisu nahajajo v visokih koncentracijah, in sicer kavne, ferulne, *p*-kumarne kisline in fenetilnega estra kavne kisline (CAPE) ter kombinacije kavne, ferulne in *p*-kumarne kisline, in sicer v koncentraciji 0,05 g/L. Rahlo antioksidativno učinkovitost smo izmerili le v primeru kavne kisline (9 %), v ostalih primerih se znotrajcelična oksidacija v primerjavi s kontrolo ni znižala. Glede na to, da testirane fenolne spojine, z izjemo kavne kisline, niso pokazale antioksidativne učinkovitosti v celicah, smo se vprašali, če je mogoče vzrok v tem, da spojine ne vstopijo v celice in tako posledično ne uspejo znižati znotrajcelične oksidacije. Tako smo z uporabo LC-MS analizirali profil fenolnih spojin v celični suspenziji pred in po 1-urni izpostavitvi. Pri posameznih fenolnih spojinah se je izkazalo, da le CAPE vstopa v/na celico, medtem ko pri ostalih do privzema ni prišlo. V primeru privzema izvlečka propolisa smo opazili, da v celico vstopi le del, ki vsebuje le bolj nepolarne spojine (frakcija F2). Tako smo v nadaljevanju preverili *in vivo* antioksidativno učinkovitost frakcije F2, ki je v skladu s pričakovanji znižala znotrajcelično oksidacijo.

Poleg celične ravni smo vpliv izvlečka propolisa proučili tudi na ravni proteoma. Z dvodimenzionalno elektroforezo smo analizirali proteinski profil celičnega ekstrakta (totalni proteom) in mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta (mitohondrijski proteom) kvasovke po 1-urni izpostavitvi. Vpliv propolisa se je na totalnem proteomu odražal minimalno, medtem ko smo na ravni mitohondrijskega proteoma opazili bolj izrazite spremembe, in sicer v okviru antioksidativnih proteinov in proteinov vključenih v sintezo ATP.

Rezultati tako na celični kot tudi na proteomski ravni so pokazali, da propolis kot antioksidant v celici najverjetneje deluje kot lovilec radikalov, kar se kaže v znižani znotrajcelični oksidaciji in hkrati znižani ravni nekaterih endogenih antioksidativnih proteinov. Posledično celica v prisotnosti eksogenih antioksidantov očitno potrebuje manj energije za sintezo endogenih antioksidativnih proteinov oz. za vzdrževanje redoks homeostaze, kar smo opazili tudi iz upada ravni encima, ki sodeluje pri sintezi ATP.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Ahn M.R., Kumazawa S., Hamasaka T., Bang K.S., Nakayama T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 7286-7292
- Ahn M.R., Kumazawa S., Ushi Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F., Nakayama T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry, 101: 1383-1392
- Atlas R.M., Lawrence P. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press: 1006-1007
- Batič M., Rapor P. 2000. Kvasna biomasa kot vir antioksidativnih snovi. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67-75
- Bors W., Heller W., Michel C., Stettmaier K. 1996. Flavonoids and polyphenols: Chemistry and biology. V: Handbook of antioxidants. Cadenas E., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc: 409-466
- Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas: 31-33
- Berggren K., Chernokalskaya E., Steinberg T.H., Kemper C., Lopez M.F., Diwu Z., Haugland R.P., Patton W.F. 2000. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. Electrophoresis, 21: 2509-2521
- Burdock G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical Toxicology, 36: 347-363
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254
- Brodnjak-Vončina D. 2006. Analizna kemija II. Zbrano gradivo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 108-118

Castelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bolwell G.P., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. FEBS Letters, 368: 188-192

Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into aging, apoptosis and diseases. Molecular Aspects of Medicine, 22: 217-246

Eastwood M.A. 1999. Interaction of dietary antiokxidants *in vivo*: How fruit and vegetables prevent disease. QJM: An International Journal of Medicine, 92: 527-530

Farah A., Donangelo C.M. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18, 1: 23-36

Fuge E.K., Braun E.L., Werner-Washburne M. 1994. Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 176, 18: 5802-5813

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippson P., Tettelin H., Oliver S.G. 1996. Life with 6000 genes. Science, 274: 546-567

Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21: 1037-1053

Görg A., Klaus A., Lück C., Weiland F., Weiss W. 2007. Today's 2-D electrophoresis technology. V: HUPO 2007. Education program. October 6, 2007. Seoul. Montreal, HUPO: Human Proteome Organization: 14 str.

Gregoris E., Stevanto R. 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. Food and Chemical Toxicology, 48: 76-82

Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. Annual Review of Nutrition, 16: 33-50

Herman P.K. 2002. Stationary phase in yeast. Current Opinion in Microbiology, 5: 602-607

Herzog-Velikonja B., Gruden K., Pašić L. 2001. Praktikum iz molekularne biologije. Ljubljana, Študentska založba: 78 str.

Isla M.I., Nieva Moreno M.I., Sampietro A.R., Vattuone M.A. 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 165-170

Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29: 1297-1301

Jamnik P., Gordanovič D., Raspor P. 2007. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. *Experimental Gerontology*, 42, 7: 594-600

Jasprica I., Mornar A., Debeljak Ž., Smolčić-Bubalo A., Medić-Šarića M., Mayer L., Romić Ž., Bućan K., Balog T., Sobočanec S., Šverko V. 2007. *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 3: 548-554

Kanbur M., Eraslan G., Silici S. 2009. Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 909-915

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 249 str.

Kumazawa S., Hamasaki T., Nakayama T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84: 329-339

Kuraja A. 2009. *In vitro* ter *in vivo* antioksidativna učinkovitost etanolnih izvlečkov propolisa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54 str.

Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37

Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-31

Laskar R.A., Sk I., Roy N., Begum N.A. 2010. Antioxidant activity of indian propolis and its chemical constituents. Food Chemistry, 122: 233-237

Menacho-Márquez M., Murguía J.R. 2007. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. Clinical and Translational Oncology, 9: 221-228

Marcucci M.C. 1995. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apiologie, 26: 83-99

Mavri A., Abramovič H., Polak T., Bertoncelj J., Jamnik P., Možina S.S., Jeršek B. 2010. Chemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. Interno gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Molecular Probes. 2005. SYPRO Ruby protein gel stain. Oregon, Molecular Probes: 7 str.

Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defenses against reactive oxygen species in yeast. Molecular Microbiology, 19, 4: 651-658

Padmavathi R., Senthilnathan P., Chodon D., Sakthisekaran D. 2006. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. Life Sciences, 78: 2820-2825

Pedrotti W. 2003. Med, cvetni prah, matični mleček, propolis in štrup: lastnosti in učinki pridelkov čebeljega panja in apiterapija. Ljubljana, Pisanica: 47-52

Pennesi E. 2003. Human genome: A low number wins the GeneSweep Pool. Science, 300: 1484

NCBI. 2010a. PubChem Compound. Bethesda, NCBI: National Center for Biotechnology Information: 1 str.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> (avgust 2010)

NCBI. 2010b. Protein. Bethesda, NCBI: National Center for Biotechnology Information: 1 str.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> (avgust 2010)

- Rabilloud T., Chevallet M., Luche S., Leize-Wagner E. 2005. Oxidative stress response: a proteomic view. *Expert Review of Proteomics*, 2, 6: 949-956
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Bergles D. 2000. Bioprosesi pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-65
- Rice-Evans C.A. Miller N.J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 4: 152-159
- Russo A., Lango R., Vanella A. 2002. Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73, 1: 521-529
- Santoro N., Thiele D. J. 1997. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hofmann S., Mager W. H. (eds.). New York, Springer: 171-205
- Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 1997. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska založba: 182 str.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82: 291-295
- Silva J.F.M., Souza M.C., Matta S.R., Andrade M.R., Vidal F.V.N. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99: 431-435
- Steinberg T.H., Chernokalskaya E., Berggren K., Lopez M.F., Diwu Z., Haugland R.P., Patton W.F.. 2000. Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain. *Electrophoresis*, 21: 486-496
- Sun F., Hayami S., Haruna S., Ogiri Y., Tanaka H., Yamada Y., Ikeda K., Yamada H., Sugimoto H., Kawai N., Kojo S. 2000. *In vivo* antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1462–1465
- Sturgeon C.M., Kemmer D., Anderson H.J., Roberge M. 2006. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Journal of Biotechnology*, 1: 289-298
- Turrens J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552, 2: 335-344

Vermerris W., Nicholson R. 2008. Phenolic compound biochemistry. New York, Springer: 276 str.

Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Current Pharmaceutical Design, 10: 1677-1694

Zheng J., Ramirez V.D. 2000. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. British Journal of Pharmacology, 130: 1115-1123

Wilson K., Walker J. 2000. Principles and techniques of practical biochemistry. 5th ed. Cambridge, University Press: 586-588

ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Poloni Jamnik se zahvaljujem za ves čas in trud, ki ga je namenila nastanku tega diplomskega dela. Hvaležna sem za vse strokovne nasvete in razprave, katere so pripomogle k moji notranji rasti. Prav tako hvala za vse bolj sproščene pogovore in vzpodbudne besede, zaradi katerih sem delo opravljala z velikim veseljem.

Somentorju dr. Tomažu Polaku se zahvaljujem za ideje in pomoč pri izvedbi praktičnega dela ter strokoven in temeljit pregled diplomske naloge.

Recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću se zahvaljujem za strokoven in temeljit pregled diplomskega dela ter drugačno razmišljanje, ki sem ga pridobila z njegovimi vprašanji.

Zahvaljujem se prof. dr. Lei Gašperlin, ki mi je pomagala pri statističnih analizah rezultatov.

Zahvaljujem se Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, ki mi je omogočila nastanek tega diplomskega dela. Predvsem pa hvala Dragici, ki mi je pomagala pri urejanju dokumentacije.

Hvala Katji in Teji za pomoč pri laboratorijskem delu ter za pripravljenost odgovarjati na vprašanja. Zahvala gre tudi Marku in Mileni, ki sta mi vedno priskočila na pomoč v laboratoriju in prispevala k toplemu vzdušju pri delu.

Zahvala gre tudi čebelarju Tomažu Kramarju, ki je priskrbel propolis za našo študijo.

Boštjan hvala za podporo in pomoč pri nastanku tega diplomskega dela.

Hvala staršem in bratu, ker ste mi stali ob strani in me spodbujali tekom študija.

Hvala Vam!

PRILOGE

Priloga A: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostaviti fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP) v koncentraciji 0,05, 0,1 in 0,2 g/L glede na kontrolo

fenolne spojine EIP _{DMSO}				
c (g/L)	0	0,05	0,10	0,20
FI	50000	26693	27963	33501
	47107	26124	27697	31173
	50878	26179	29222	27284
	48146	26391	36832	36618
	49722	27084	29307	34241
	45532	27990	25402	35503
povprečje FI	48564	26744	29404	33053

Priloga B: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostaviti fenolnih spojin etanolnega izvlečka propolisa (EIP) v koncentraciji 0,0125, 0,025 in 0,05 g/L glede na kontrolo

fenolne spojine EIP _{DMSO}				
c (g/L)	0	0,0125	0,025	0,05
FI	56478	38629	32813	36421
	58785	38594	32733	33948
	58569	38864	34801	34227
	58078	36842	34472	34239
	54108	34883	34386	34725
	56625	37569	34924	31651
povprečje FI	57107	37564	34022	34202

Priloga C: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostaviti različnim koncentracijam dimetil sulfoksida (DMSO)

DMSO				
c (%(v/v))	0	0,25	0,5	1
FI	48230	50555	60768	"overflow"
	50959	50026	61672	"overflow"
	49156	46859	60100	"overflow"
	47996	47181	61906	"overflow"
povprečje FI	49085	48655	61112	/

Priloga D: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitevi posameznih fenolnih spojin in kombinacije fenolnih spojin v koncentraciji 0,05 g/L glede na kontrolo

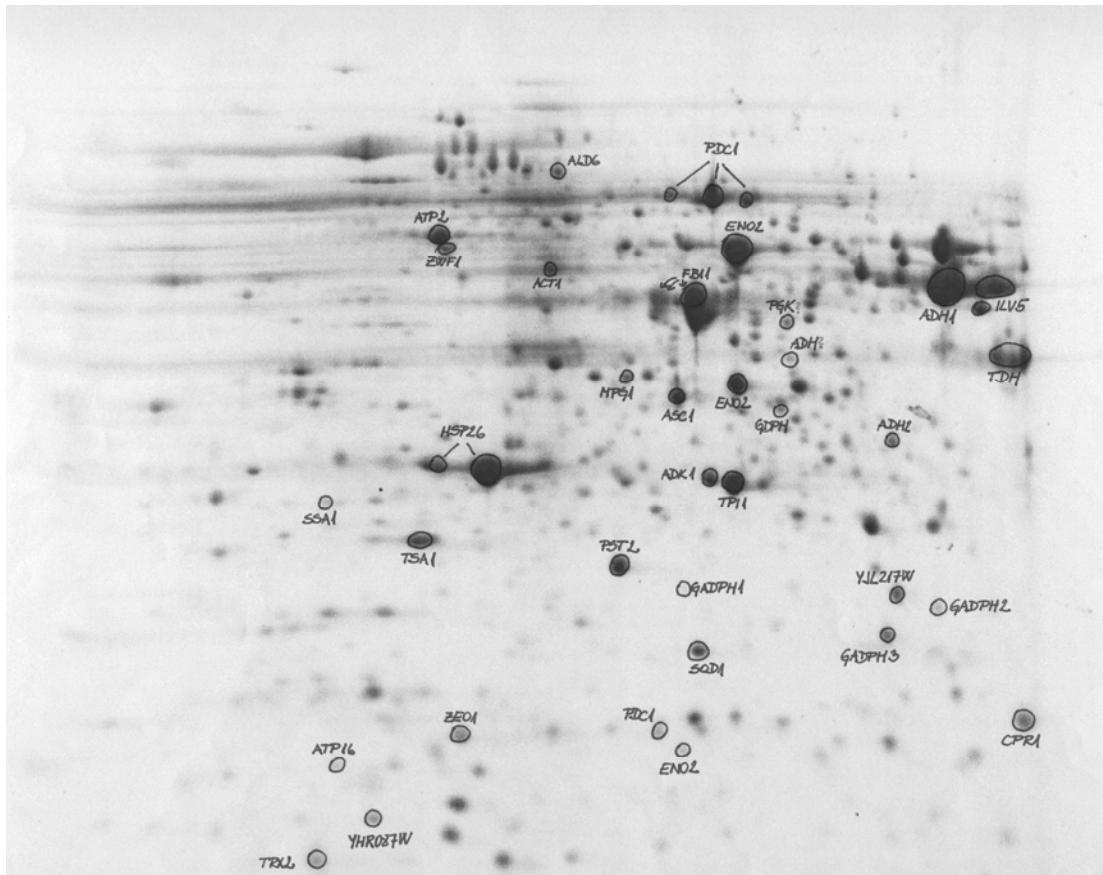
		kavna kislina	p-kumarna kislina	ferulna kislina
c (g/L)	0-kontrola	0,05	0,05	0,05
FI	53237	47339	49629	48724
	53030	50316	48779	50570
	52855	50241	51439	52420
	48387	42521	50243	54530
	50703	45522	49870	52842
	50740	44773	48430	/
povprečje FI	51492	46785	49732	51817
kombinacija kavne, p-kumarne in ferulne kisline				
c (g/L)	0-kontrola	0,05		
FI	52871	53357		
	55697	53765		
	52141	57614		
	47527	56036		
	56104	53766		
	44130	53944		
povprečje FI	51412	54747		
CAPE				
c (g/L)	0-kontrola	0,05		
FI	36682	47446		
	43082	49700		
	44493	47643		
	51770	50074		
	52914	51325		
	51576	49713		
povprečje FI	46753	49317		

Priloga E: Meritve fluorescenčne intenzitete za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 1-urni izpostavitvi frakciji F1 in F2 glede na kontrolo

		F1	F2
c (g/L)	0-kontrola	*	*
FI	50406	50328	38607
	49561	50598	41930
	50257	51112	42414
	48301	51160	38091
	49690	52427	39922
	49194	50961	37067
povprečje FI	49568	51098	39672

* ekvivalentna konc. fenolnih spojin v EIP (0,05 g/L)

Priloga F: Proteinska mapa (totalni proteini) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* predhodno izdelana v Laboratoriju za proteomiko



Priloga G: Proteinska mapa (mitohondrijski proteini) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* predhodno izdelana v Laboratoriju za proteomiko

