

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vida KOCBEK

**VPLIV Cr(VI) IONOV NA OKSIDATIVNE POŠKODBE
LIPIDOV IN PROTEINOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF Cr(VI) IONS ON OXIDATIVE DAMAGE OF
LIPIDS AND PROTEINS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorico doc. dr. Polono Jamnik in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Mentor: prof. dr. Peter RASPOR

Somentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Recenzent: prof. dr. Tom TURK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vida Kocbek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22+579.24:546.76:547.9(043)=163.6
KG	kvasovke/fiziologija kvasovk/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /stres/oksidativni stres/Cr(VI) ioni/poškodbe lipidov/poškodbe proteinov
AV	KOCBEK, Vida
SA	RASPOR, Peter (mentor)/JAMNIK, Polona (somentorica)/TURK, Tom (recenzent)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	VPLIV Cr(VI) IONOV NA OKSIDATIVNE POŠKODBE LIPIDOV IN PROTEINOV
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XI, 81 str., 4 pregl., 9 sl., 8 pril., 96 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preučiti vpliv Cr(VI) ionov na oksidativne poškodbe lipidov in proteinov pri kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – ZIM 2155. Kulturi kvasovk smo v sredini eksponentne in na začetku stacionarne faze rasti dodali 1 mM koncentracijo Cr(VI) ionov in jo izpostavili za 15 min, eno in dve uri. Z dodatkom komercialnega pripravka, ki vsebuje barvilo SYTO [®] 9 in propidijev jodid, smo določali živost celic. Poškodbe proteinov smo merili s spektrofotometrično metodo, ki meri količino karbonilov, poškodbe lipidov pa smo določali po metodi, ki temelji na kislinski razgradnji lipidnih hidroperoksidov v malondialdehide. Rezultati so pokazali, da je stopnja preživetja celic na začetku stacionarne faze rasti višja kakor v sredini eksponentne faze, kar je posledica že vključenih obrambnih mehanizmov in manjše metabolne aktivnosti celic. Celice v stacionarni fazi so tudi bolj odporne na stres. Tudi vsebnost karbonilov se je zmanjšala, nižje vrednosti pa smo ponovno izmerili na začetku stacionarne faze rasti, kar ponovno kaže na učinkovit sistem za odstranjevanje oksidativno poškodovanih proteinov. Primerjava vsebnosti malondialdehidov med kontrolnim in poskusnim vzorcem nam v eksponentni in stacionarni fazi rasti ne pokaže bistvenih sprememb, iz česar smo sklepali, da so poškodbe lipidov manj izrazite.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.22+579.24:546.76:547.9(043)=163.6
CX	yeasts/yeast physiology/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /stress/oxidative stress/Cr(VI) ions/lipids damage/proteins damage
AU	KOCBEK, Vida
AA	RASPOR, Peter (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/TURK, Tom (reviewer)
PP	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	THE EFFECT OF CR(VI) IONS ON OXIDATIVE DAMAGE OF LIPIDS AND PROTEINS
DT	Graduation Thesis
NO	XI, 81 p., 4 tab., 9 fig., 8 ann., 96 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	<p>The object of our research was to study the effect of Cr(VI) ions on oxidative damage of lipids and proteins in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – ZIM 2155. We added 1 mM of Cr(VI) ions to our culture in the middle of exponential and in the beginning of stationary phase of growth and treated it for 15 min, 1h and 2 h. By adding a commercial kit with SYTO® 9 and propidium iodide dyes we assessed the cell viability. Protein damages were measured spectrophotometrically with a method that determines the amount of carboniles. Lipid damages were determined according to the method that is based on acidic degradation of lipid hydroperoxides to malondialdehydes. Our results showed that cell viability is higher in the beginning of stationary phase than in the middle of exponential. This is a consequence of defense mechanisms already turned on and lesser metabolic activity of the cells in exponential phase. The amount of carboniles decreases. Lower values were measured again in the stationary faze of growth which shows us an efficient system for eliminating oxidatively damaged proteins. We compared the malondialdehyd amount of control sample and treated sample in the stacionary phase. The results do not show any relevant changes, therefore we concluded that lipid damages are less distinctive.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	X
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 STRES.....	3
2.1.1 Oksidativni stres	3
2.2 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI.....	4
2.2.1 Kaj so reaktivne kisikove zvrsti?	4
2.2.2 Viri reaktivnih kisikovih zvrsti	5
2.2.3 ROS.....	5
2.3 TARČE ROS V CELICI IN POŠKODBE CELIČNIH KOMPONENT.....	7
2.3.1 Tarče ROS v celici	7
2.3.2 Poškodbe proteinov	7
2.3.3 Poškodbe lipidov	10
2.3.4 Poškodbe DNA	12
2.4 KOVINSKI IONI IN OKSIDATIVNI STRES	13
2.4.1 Kovinski ioni in oksidativni stres	13
2.4.2 Kromovi ioni	14
2.4.2.1 Krom- splošno	14
2.4.2.2 Kromovi (VI) in (III) ioni.....	14
2.4.2.3 Transport Cr(VI) v celico	15

2.4.2.4	Vloga kroma pri oksidativnih poškodbah.....	15
2.5	ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI.....	16
2.5.1	Primarni antioksidativni obrambni sistem	17
2.5.2	Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi.....	18
2.6	METODE DETEKCIJE.....	19
2.6.1	Detekcija ROS.....	19
2.6.2	Detekcija lipidne peroksidacije	19
2.6.3	Detekcija poškodovanih proteinov.....	20
3	MATERIALI IN METODE	21
3.1	POTEK DELA.....	21
3.2	MATERIALI.....	22
3.2.1	Mikroorganizem	22
3.2.2	Gojišča	22
3.2.2.1	Tekoče YEPD gojišče.....	22
3.2.2.2	Trdno YEPD gojišče.....	23
3.2.3	Reagenti in raztopine	23
3.2.3.1	Izpostavitev celic kvasovk Cr(VI).....	23
3.2.3.2	Štetje celic	24
3.2.3.3	Določanje živosti celic.....	24
3.2.3.4	Določanje oksidativnih poškodb proteinov	24
3.2.3.5	Določanje oksidativnih poškodb lipidov	25
3.2.4	Oprema.....	26
3.3	METODE.....	28
3.3.1	Priprava in ohranjanje kulture kvasovk.....	28
3.3.2	Priprava inokuluma	28
3.3.3	Aerobna submerzna kultivacija- glavni poskus.....	28
3.3.4	Izpostavitev celic kvasovk Cr(VI).....	29
3.3.5	Določanje živosti	29
3.3.6	Določanje oksidativnih poškodb proteinov	30
3.3.7	Določanje poškodb lipidov.....	31
3.3.8	Statistična obdelava podatkov.....	32
4	REZULTATI	34
4.1	DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE KVASOVKE.....	35
4.2	DOLOČANJE ŽIVOSTI KVASOVKE	36
4.3	DOLOČANJE OKSIDATIVNIH POŠKODB PROTEINOV	39
4.4	DOLOČANJE OKSIDATIVNIH POŠKODB LIPIDOV	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA.....	43
5.1.1	Vpliv Cr(VI) ionov na živost celic kvasovk	44
5.1.2	Vpliv Cr(VI) ionov na vsebnost karbonilov	45

5.1.3 Vpliv Cr(VI) ionov na lipidno peroksidacijo	46
5.2 SKLEPI	48
6 POVZETEK.....	49
7 VIRI.....	51

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1:	Pregled primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Sigler in sod., 1999; Walker, 1998)	str. 17
Preglednica 2.2:	Pregled sekundarnih antioksidativnih obrambnih sistemov (Halliwell in Gutteridge, 1999)	str. 18
Preglednica 3.1:	Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)	str. 22
Preglednica 3.2:	Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)	str. 23

KAZALO SLIK

Slika 3.1:	Shema glavnega poskusa	str. 21
Slika 4.1:	Rastna krivulja kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (T=28 °C, 200 obr./min)	str. 35
Slika 4.2:	Živost celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri treh različnih časih glede na kontrolo po izpostavitvi stresane kulture kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 2155 v sredini eksponentne faze rasti 1mM Cr(VI)	str. 36
Slika 4.3:	Živost celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v treh različnih časih glede na kontrolo po izpostavitvi stresane kulture kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 2155 na začetku stacionarne faze rasti. 1mM Cr(VI)	str. 37
Slika 4.4:	Primerjava živosti celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v sredini eksponentne in na začetku stacionarne faze rasti	str. 38
Slika 4.5:	Primerjava vsebnosti karbonilov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) po izpostavitvi Cr(VI) v sredini eksponentne faze rasti kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	str. 39
Slika 4.6:	Primerjava vsebnosti karbonilov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) na začetku stacionarne faze rasti stresane kulture kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	str. 40
Slika 4.7:	Primerjava vsebnosti malondialdehidov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) po izpostavitvi Cr(VI) v sredini eksponentne faze rasti kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	str. 41
Slika 4.8:	Primerjava vsebnosti malondialdehidov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) po izpostavitvi Cr(VI) na začetku stacionarne faze rasti kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	str. 42

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje mase skupnih proteinov v biomasi kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*- ZIM 2155.
- Priloga B1: Izračunane vrednosti s povprečno vrednostjo in standardno deviacijo za živost v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Priloga B2: Izračunane vrednosti s povprečno vrednostjo in standardno deviacijo za živost na začetku stacionarne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Priloga B3: Izračunane vrednosti za vsebnost karbonilov ter povprečna vrednost in standardna deviacija v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Priloga B4: Izračunane vrednosti za vsebnost karbonilov ter povprečna vrednost in standardna deviacija na začetku stacionarne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Priloga B5: Izračunane vrednosti za vsebnost malondialdehidov ter povprečna vrednost in standardna deviacija v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Priloga B6: Izračunane vrednosti za vsebnost malondialdehidov ter povprečna vrednost in standardna deviacija na začetku stacionarne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

d H ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
e ⁻	elektron
Fe	železo
H	vodik
h	ura
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
M	mol/L
mM	10 ⁻³ mol/L
MDA	malondialdehid
min	minuta
obr./min	obrati na minuto
OD	optična gostota
O ₂	kisik
λ	valovna dolžina
P1	protein 1
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
R·	radikal
S	žveplo
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	standardna deviacija
t	čas
YEPD	gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

1 UVOD

Kvasovke in ostali aerobni organizmi so nenehno izpostavljeni toksičnim učinkom molekulskega kisika, saj reaktivne kisikove zvrsti – ROS nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom (Moradas-Ferreira in sod., 1996). V normalnih razmerah so antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo količino ROS na osnovni neškodljivi ravni. Če se učinkovitost antioksidativnih obrambnih sistemov preseže, govorimo o oksidativnem stresu (Moradas- Ferreira in sod., 1996).

ROS nastajajo pri številnih redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa kisika. Če kisik med redukcijo ne sprejme vseh 4 elektronov, nastanejo ROS, med katere prištevamo superoksidni, hidroksilni in peroksidni radikal ter singletni kisik in vodikov peroksid (Halliwell in Gutteridge, 2000).

ROS lahko povzročajo poškodbe vseh biomolekul, vključno z lipidi, proteini in DNA. Poškodbe so lahko reverzibilne, pri čemer imajo pomembno vlogo antioksidativni obrambni sistemi ali ireverzibilne poškodbe, ki se več ne morejo popraviti zato se celica usmeri v celično smrt (Halliwell in Gutteridge, 1999). Za poškodbe proteinov je večinoma odgovoren hidroksilni radikal. Ta nastaja v Fentonovi reakciji z redukcijo vodikovega peroksida, povzroča pa nastanek karbonilov, ki smo jih tudi sami merili. Karbonili nastanejo z oksidacijo specifičnih aminokislin in zlomom polipeptidne verige (Stadtman, 1992). Hidroksilni radikal ireverzibilno poškoduje proteine zato se ti razgradijo do peptidov in aminokislin (Godon in sod., 1998).

ROS napadajo tudi polinenasičene maščobne kisline, ki so zelo občutljive na oksidacijo. Lipidna peroksidacija se začne s katerim koli radikalom, postopek pa zajema tri faze: iniciacija, verižna reakcija in zaključna faza, kjer nastajajo različni aldehidi, najbolj znan je malondialdehid (Halliwell in Gutteridge, 1999). Tega smo tudi sami merili in ga uporabili kot oceno lipidne peroksidacije.

1.1 CILJI NALOGE

Cilj te diplomske naloge je bil preveriti ali ob izpostavljenosti celic kvasovke *S. cerevisiae* Cr(VI) ionom pride do oksidativnih poškodb proteinov in lipidov.

Za modelni organizem smo izbrali celice kvasovke *S. cerevisiae*, ki smo jih izpostavili Cr(VI) ionom. Merili smo vsebnost karbonilov in malondialdehidov, preko katerih smo sklepali na poškodbe proteinov oziroma lipidov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Trdimo, da izpostavljenost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* Cr(VI) ionom v določenih koncentracijah povzroči nastanek karbonilov in povzroči peroksidacijo lipidov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STRES

Stres pomeni vsak odmik od optimalnih razmer za rast celic. Razlikujemo blag in močen stres; blag stres se nanaša na razmere v okolju, ki še dovoljujejo rast, medtem ko je rast v primeru močnega stresa popolnoma zaustavljena (Ruis, 1997).

Molekulske mehanizme, ki se sprožijo ob izpostavitvi celic stresnim razmeram, imenujemo stresni odgovor. Cilj teh odgovorov je, da celico zaščitijo pred delovanjem škodljivih stresnih dejavnikov in popravijo morebitne poškodbe. Stresni odgovori imajo za posledico spremembe v encimski aktivnosti in izražanju genov, kar vodi do prilagoditve metabolizma na stres (Mager in Hohmann, 1997). Prilagoditev na stres vključuje zgodnje odgovore, ki nudijo takojšnjo zaščito, kažejo pa se v spremembi aktivnosti že obstoječih encimov in pa pozne odgovore, ki nudijo bolj učinkovito zaščito preko aktivacije signalnih poti. Pozni stresni odgovori so lahko specifični ali splošni, oboji pa privedejo do sprememb v izražanju genov in do pridobitve tolerance na stres (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.1.1 Oksidativni stres

Oksidativni stres je definiran kot porušenje ravnotežja med nastankom reaktivnih kisikovih vrst- ROS in antioksidanti v celici (Betteridge, 2000).

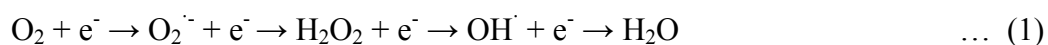
Neravnotežje med antioksidanti in oksidanti je lahko posledica izpostavljenosti celic različnim okoljskim stresnim dejavnikom (prisotnost oksidantov, kovinskih ionov, etanola in temperaturnega šoka), mutacij v encimih, ki sodelujejo pri obrambi ali zaradi pomanjkanja antioksidantov (Moradas- Ferreira in sod., 1996).

Kvasovke in drugi aerobni organizmi so nenehno izpostavljeni toksičnim učinkom molekulskega kisika. Reaktivne kisikove zvrsti nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom; med dihanjem in s številnimi reakcijami, ki jih katalizirajo oksidaze (Moradas-Ferreira in sod., 1996). V normalnih razmerah so naravni antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo količino ROS na osnovni, neškodljivi ravni. Sem prištevamo primarne antioksidativne obrambne sisteme, ki odstranjujejo ROS in pa sekundarne antioksidativne obrambne sisteme, ki odstranjujejo poškodovane molekule. V primeru, ko se učinkovitost endogenih antioksidativnih obrambnih sistemov preseže, nastopi oksidativni stres (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

2.2 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI

2.2.1 Kaj so reaktivne kisikove zvrsti?

Dodajanje elektronov molekulskega kisiku vodi k nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti, med katere prištevamo superoksidni, hidroksilni in peroksidni radikal ter singletni kisik in vodikov peroksid (Miller in sod., 1990; Sigler in sod. 1999). Tako pojem reaktivne kisikove zvrsti zajema molekule kisika v različnih reduciranih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom (Moradas-Ferreira in sod., 1996). ROS nastajajo pri številnih redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektronov in če kisik med redukcijo ne sprejme vseh 4 elektronov (enačba 1), nastanejo ROS (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000). Primarne ROS v celici reagirajo z bližnjimi molekulami (proteini, lipidi, nukleinske kisline), pri čemer nastajajo funkcionalno neustrezne spojine, ki jih imenujemo sekundarne ROS (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000). Kopičenje takšnih molekul povzroča staranje celice in sproži programirano celično smrt (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).



2.2.2 Viri reaktivnih kisikovih zvrsti

ROS nastajajo s pomočjo endogenih ali eksogenih virov. Endogeni viri vključujejo mitohondrije, citokrom P450, peroksisome, mikrosome in vnetne celične odzive, pri katerih sodelujejo nevtrofilci, eozinofilci in makrofagi. Med eksogenimi viri prevladujejo radiacija in različni okoljski agensi, kamor uvrščamo ksenobiotike in kovinske ione (Inoue in sod., 2003; Gupta in sod., 1997; Klaunig in sod., 1997).

V mitohondrijih nastajajo velike količine vodikovega peroksida- H_2O_2 in superoksidnega radikala. Zaradi tega so v mitohondrijih prisotni antioksidativni obrambni sistemi, kot sta superoksid dismutaza in glutation peroksidaza, ki sta prisotna na obeh straneh mitohondrijske membrane z namenom zaščititi celico pred oksidativnim stresom (Inoue in sod., 2003; Loschen in Flohe., 1971; Cadenas in Davies, 2000).

Tudi v peroksisomih nastajajo velike količine vodikovega peroksida, ne pa tudi superoksidni radikal (Gupta in sod., 1997; Valko in sod., 2004). Peroksisomi so glavno mesto porabe kisika v celici in sodelujejo v številnih metabolnih poteh, ki porabljajo kisik. Poraba kisika vodi do nastanka vodikovega peroksida, ki deluje kot oksidant številnih molekul. Ta organel vsebuje številne katalaze, ki razgrajujejo vodikov peroksid, s tem pa se preprečuje kopičenje vodikovega peroksida. Ko so peroksisomi uničeni, se vodikov peroksid sprosti v citosol, kar veliko prispeva k oksidativnemu stresu (DeCoursey in Ligeti, 2005).

2.2.3 ROS

Superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$) nastane z aktivacijo molekulskega kisika v prvi stopnji redukcije in spada med primarne ROS (Valko in sod., 2005). Je nabita molekula, zato težko prehaja preko membrane. Glavni vir nastanka so mitohondriji (Cadenas in Sies, 1998), kjer določeno število elektronov pobegne iz elektronske transportne verige, ti pa namesto redukcije kisika v vodo tvorijo superoksid (Kovacic in sod., 2005; Valko in sod., 2004; Muller in sod., 2004). Superoksidni radikal ne more direktno reagirati s polipeptidi,

nukleinskimi kislinami in sladkorji, tudi njihova zmožnost peroksidacije lipidov je še zaenkrat vprašljiva (Desideri in Falconi, 2003). Encim superoksid dismutaza ga razgradi do vodikovega peroksida (Michiels in sod., 1994).

Pomemben vir superoksidnega radikala je tudi encim ksantin oksidaza, ki katalizira hidroksilacijo purinov. Ta encim pretvori hipoksantin do ksantina, nato pa le tega v sečno kislino, ki deluje kot antioksidant in odstranjevalec ROS. Med procesom pretvorbe se molekularni kisik reducira, pri čemer nastajata superoksidni radikal in vodikov peroksid. Tako je ta encim na eni strani pomemben vir prostih radikalov, po drugi strani pa s pretvorbo hipoksantina do sečne kisline deluje kot antioksidant (Valko in sod., 2004; Borges in sod., 2002; Vorbach in sod., 2003).

Hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) je zelo reaktiven in nevaren radikal s kratko razpolovno dobo (Pastor in sod., 2000). Navadno reagira blizu mesta, kjer je nastal (Liochev in Fridovich, 1994). Neposredno lahko reagira s skoraj vsemi celičnimi komponentami (sladkorji, proteini, nukleinske kisline) (Sigler in sod., 1999). V bioloških sistemih nastaja s homolitično cepitvijo O-O vezi v vodikovem peroksidu. Najpogostejši viri nastanka hidroksilnega radikala so Fentonova reakcija, UV in ionizirajoče sevanje, ultrazvok in hipoklorna kislina. Je najbolj reaktiven radikal z visokim pozitivnim redukcijskim potencialom (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Vir vodikovega peroksida so encimi kot sta ksantin in razne oksidaze. Ima neposredno sposobnost inaktivacije številnih encimov z oksidacijo labilnih esencialnih tiolnih skupin na aktivnem mestu encima (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), s sproščanjem železa iz aktivnega mesta pa lahko poškoduje tudi številne hem proteine. Oksidira lahko tudi keto kisline, kot sta piruvat in 2-oksoglutarat (Halliwell in Gutteridge, 1999). Nastaja iz superoksidnega radikala s pomočjo superoksid dismutaze (Loschen in Flohe, 1971). Ker ne vsebuje neparnih elektronov, ga ne uvrščamo med radikale (Santoro in Thiele, 1997).

Med radikali, ki izvirajo iz kisika, je pogost tudi peroksidni radikal ($\text{ROO}\cdot$). Najpreprostejši peroksidni radikal je $\text{HOO}\cdot$, ki predstavlja protonirano obliko superoksidnega radikala in je navadno poimenovan hidroperoksidni ali perhidroksidni radikal. Le okoli 0,3 % superoksidnega radikala v celici je v protonirani obliki (De Grey, 2002).

Med kisikove radikale uvrščamo tudi singletni kisik, ki je veliko boljši oksidant kakor navadni kisik. Med drugim nastaja tudi v laboratoriju s fotosenzibilno reakcijo z vzbujanjem elektronov. Napada fotosenzibilne molekule ali reagira z drugimi prisotnimi molekulami. Fotosenzibilne reakcije so pomembne predvsem v kloroplastih, ki vsebujejo klorofil in velike količine kisika (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.3 TARČE ROS V CELICI IN POŠKODBE CELIČNIH KOMPONENT

2.3.1 Tarče ROS v celici

Poškodbe biomolekul so rezultat kemijskih ali fizikalnih učinkov na celice, kar vodi k porušenju ravnotežja v celici. ROS lahko povzročijo poškodbe vseh biomolekul, vključno z DNA, lipidi in proteini (Sigler in sod., 1999). Poškodbe molekul so lahko reverzibilne, pri čemer je zelo pomembna vloga antioksidativnih obrambnih sistemov in stresnih proteinov. Če so poškodbe ireverzibilne, se več ne morejo popraviti in celica je usmerjena v celično smrt (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.3.2 Poškodbe proteinov

ROS lahko direktno napadejo proteine in jih poškodujejo. Do poškodb proteinov lahko pride tudi s produkti lipidne peroksidacije. Čeprav so oksidacije sposobne vse reaktivne kisikove zvrsti, prav hidroksilni radikal predstavlja prevladujoč dejavnik za oksidacijo proteinov (Halliwell in Gutteridge, 1999; Welch in sod., 2001; Costa in Moradas-Fereirra, 2001). Proteini se lahko pred oksidacijo zaščitijo s topno trehalozo, delno odviti proteini pa tudi s šaperoni (Benaroudj in sod., 2001; Sigler in sod., 1999).

Oksidacija proteinov lahko vodi do nastanka oksidiranih aminokislin, sprememb aminokislin v reaktivne karbonile, kar privede do izgube katalitične funkcije in povečane občutljivosti na denaturacijo in proteolizo (Beckman in Ames, 1997; Dean in sod., 1997; Stadtman in sod., 1992). Akumulacijo oksidiranih proteinov navadno merimo z vsebnostjo reaktivnih karbonilov s spektrofotometričnim testom, ki za specifični marker vsebuje 2,4-dinitrofenilhidrazin (Stadtman in sod., 1992; Levine in sod., 1994).

Superoksidni radikal nastane v prvi stopnji redukcije kisika. Je šibka baza z majhno reaktivnostjo za večino biomolekul. Prisotnost naboja omejuje njegovo gibljivost skozi membrane. Povzroči lahko nastanek visoko reaktivnih ROS, kot so vodikov peroksid, hidroksilni radikal in singletni kisik. Kljub majhni reaktivnosti lahko ta radikal povzroči inhibicijo antioksidativnih encimov, kot sta glutathion peroksidaza in delno katalaza. Inhibira tudi mitohondrijske encime, kot so NADH dehidrogenaza, NADH oksidaza in mitohondrijska ATP-aza (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 2000). Lahko tudi direktno reagira s Fe-S centri v aktivnih mestih encimov, kot je akonitaza in druge hidrolaze. Ta reakcija vodi do inaktivacije encimov in povečane količine prostega železa v celici, kar povzroči še dodatne oksidativne poškodbe (Halliwell in Gutteridge, 2000).

Vodikov peroksid inaktivira encime z oksidacijo esencialnih tiolnih skupin cisteinskih in metioninskih ostankov. Oksidacija žveplovih aminokislin je reverzibilna (Lee in sod., 1999).

Oksidacija cisteinskih ostankov vodi do nastanka disulfidov med proteinsko tiolno skupino in nizkomolekularnimi tioli (glutathion, cistein, δ - glutamil- cistein). Do tvorbe disulfidov lahko pride znotraj proteina (P1-S-S-P1) ali med dvema različnima proteinoma (P1-S-S-P2). Ker so te poškodbe reverzibilne, se lahko popravijo z redukcijo z glutathionom, glutaredoksinom, tioredoksinom ali pa s pomočjo encimov, kot sta disulfid izomeraza ali tiol transferaza (Lee in sod., 1999; Levine in sod., 1996; Stadtman, 2001; Levine in Stadtman, 2001).

Vodikov peroksid oksidira tudi metioninske ostanke v metionin sulfokside in sulfone. Metionin sulfoksid reduktaza lahko popravi zmerno oksidirane proteine z redukcijo metionin sulfoksida do metionina (Moskovitz in sod., 1997). Ciklična oksidacija in

redukcija metioninskih ostankov tako predstavljata pomembno zaščito pred oksidativnimi poškodbami (Lee in sod., 1999).

Hidroksilni radikal, ki v Fentonovi reakciji nastane z redukcijo vodikovega peroksida, povzroča najbolj izrazite oksidativne poškodbe in nastanek karbonilov. Karbonili nastanejo z oksidacijo specifičnih aminokislin (arginin, prolin, histidin in lizin) in zlomom polipeptidne verige na mestu prolina, glutamata ali aspartata. Z redoks aktivnimi kovinami povzročena oksidacija proteinov je le ena izmed mnogih poti nastanka karbonilov. Najpogostejše tarče, ki se na ta način okvarijo so gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza in številni drugi mitohondrijski encimi. Do nastanka karbonilov lahko pride po encimski poti z glikozilacijo ali pa preko nastanka ketoaminov (Stadtman, 1992; Levine in sod., 1994; Cabiscol in sod., 2000).

Hidroksilni radikal, ki povzroči nastanek karbonilov, ireverzibilno poškoduje proteine. Taki proteini se ne morejo popraviti, zato so označeni in se razgradijo na peptide ali celo na posamezne aminokislino. Razgradnja poteka s 26S proteasomom, ki vsebuje številne proteaze. Zelo oksidirani proteini se združujejo v skupke, ki jih proteasom ne more razgraditi, zato pride do njihovega kopičenja, kar vodi do nastanka različnih bolezni (Godon in sod., 1998; Lee in sod., 1999).

Produkt oksidacije proteinov predstavljajo tudi spojine, ki nastajajo zaradi delovanja AGE (Advanced glycation end product). So rezultat reakcije med ogljikovimi hidrati in prostimi amino skupinami proteinov. Ti produkti so znani pod različnimi imeni: Amadori, Schiff Base ali Maillard produkti. So zelo nestabilne in reaktivne komponente, ki jih je težko analizirati. Najbolj poznana AGE produkta sta pentozidin in karboksimetil lizin (Dalle-Donne in sod., 2005).

Ločimo blago oksidirane proteine, kjer je modificiranih od 2 do 9 aminokislin na protein, oksidacija pa povzroči spremembo sekundarne in terciarne strukture proteinov. Blago oksidirani proteini se razgradijo s proteasomom, kar je posledica aerobnega metabolizma (Davies, 2001).

Pri hujših poškodbah se oksidira več kakor 10 aminokislin na protein. Takrat nastane več proteinskih fragmentov in navzkrižno povezanih in agregiranih proteinov odpornih na proteolizo (Grune in sod., 1995; Davies, 2001).

Oksidirane aminokisliline se razgradijo in lahko služijo kot vir ogljika za metabolizem, nepoškodovane ali blago poškodovane pa se lahko uporabijo za sintezo novih, nadomestnih proteinov (Davies, 2001).

2.3.3 Poškodbe lipidov

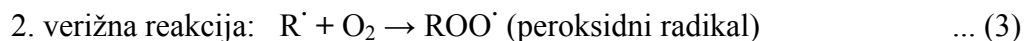
Membranski lipidi so amfipatične molekule in vsebujejo hidrofobne domene (Halliwell in Gutteridge, 1999). ROS napadajo polinenasičene maščobne kisline fosfolipidov, ki so zelo občutljivi za oksidacijo. Ta proces je avtokatalitičen in vodi do nastanka hidroperoksidov ter v naslednjih stopnjah do nastanka epoksidov, aldehydov in alkanov. Nekateri izmed teh produktov so zelo reaktivni, saj prispevajo k naraščanju količine prostih radikalov in povzročajo poškodbe DNA in proteinov. Lipidna peroksidacija poslabša strukturno integriteto membran s tvorbo krajših verig maščobnih kislin in poveča membransko fluidnost (Marnett, 1999; Do in sod., 1996; Moradas-Ferreira in sod., 1996; Halliwell in Gutteridge, 2000).

Lipidna peroksidacija se začne z napadom na lipid s katerimkoli radikalom, ki je sposoben odvzeti vodikov atom iz metilne skupine. Maščobne kisline z eno ali brez dvojnih vezi so bolj odporne na peroksidacijo.



S peroksidacijo navadno začne hidroksilni radikal, čeprav so vodikov atom iz lipida sposobni odvzeti tudi superoksidni in peroksidni radikal. Odvzem vodikovega atoma iz lipida povzroča nastanek neparnega elektrona na ogljiku, pri čemer nastane ogljikov radikal, ki se stabilizira s preureditvijo v konjugirane diene. Pri reakcijah ogljikovega radikala s kisikom dobimo peroksidni radikal ROO^{\cdot} , ta radikal pa je ponovno sposoben

odvzeti vodikov atom iz druge lipidne molekule. Ta faza peroksidacije se imenuje razmnoževalna faza, kjer ogljikov radikal ponovno reagira z novo molekulo kisika, pri tem pa nastajajo še večje količine peroksidnega radikala, ki nadaljujejo s peroksidacijo. Peroksidni radikal skupaj z odvzetim vodikom tvori lipidni hidroperoksid ROOH.



Za iniciacijo peroksidacije je pomembna prisotnost Fe(II)/Fe(III)/O₂ kompleksa. Fe(II) kelati reagirajo z lipidnimi hidroperoksidi, pri čemer nastaja alkoksilni radikal, ki lahko ponovno odvzame vodikov atom iz polinenasičenih maščobnih kislin ali iz hidroperoksidov. Fe(III) in njihovi kelati razstavijo hidroperokside na peroksidne radikale, ki nadaljujejo s peroksidacijo.

Razpad lipidnih hidroperoksidov pri visokih temperaturah vodi do nastanka mešanih kompleksov epoksidov, endoperoksidov, nenasičenih in nasičenih aldehydov ter ketonov (Halliwell in Gutteridge, 1999). Endoperoksidi so prekursorji malondialdehydov (MDA). Končni produkti lipidne peroksidacije so tako malondialdehydi in 4-hidroksi-2-nonenali (HNE) (Marnett, 1999).



MDA je dokazano mutagen, pri podganah tudi kancerogen. Reagira z DNA bazami, kjer tvori razne komplekse. HNE je šibko mutagen, vendar pa pomembno vpliva na signalne transdukcijske poti (Marnett, 1999).

Toksičnost peroksidnih radikalov je povezana z zmanjševanjem količine koencima Q in glutationa. Koencim Q in vitamin E ščitita celice pred lipidnimi peroksidnimi radikali in inhibirata širjenje lipidne peroksidacije. Podobno vlogo imajo tudi katalaze, superoksid dismutaze in lovilci hidroksilnih radikalov (Do in sod., 1996).

Lipidna peroksidacija se kaže s staranjem in slabljenjem mitohondrijskega metabolizma, saj so prav mitohondrijske polinenasičene maščobne kisline primarna tarča peroksidacije. Zmanjša se membranska fluidnost, poveča se prehodnost za različne snovi, ki navadno ne prehajajo skozi membrano, sledi tudi inaktivacija membransko vezanih encimov in izguba membranske integritete. Škodljiv vpliv peroksidacije se tako kaže pri različnih boleznih kot so arteroskleroza, rak in vnetja (Pinchuk in sod., 1998; Nyska in Kohen, 2002; Halliwell in Gutteridge 1999).

2.3.4 Poškodbe DNA

ROS povzroča tudi številne poškodbe DNA, saj je do sedaj znanih že več kot sto različnih produktov, ki so posledica le teh. Z ROS povzročene poškodbe vsebujejo enoverižne in dvoverižne DNA lome, modifikacije purinov, pirimidinov in deoksiriboz, izgubo baz ter križne povezave DNA s proteini (Marnett, 2000; Cooke in sod., 2003).

Poškodbe DNA imajo za posledico ustavitve indukcije transkripcije, indukcijo signalnih poti in napake pri podvojevanju DNA, vse to pa vodi do nastanka raka (Cooke in sod., 2003). Napake v genomu so povezane tudi s staranjem in številnimi degenerativnimi boleznimi (Halliwell in Auroma, 1991).

Oksidirane baze se odstranijo s sekundarnim antioksidativnim obrambnim sistemom: z glikozilazami, ki izrezujejo poškodovane baze ali nukleotide, mesta, kjer baze manjkajo pa nato zapolnijo AP nukleaze (Lee in Park, 1998; Gellon in sod., 2001; You in sod., 1999).

Najpogosteje raziskujejo pomen 8-hidroksigvanina, saj je ta oksidirana baza pomembna zaradi enostavnega nastanka, mutageneze in kancerogeneze, je tudi dober marker oksidativnega stresa in potencialni marker kancerogeneze. Njegova količina se znatno poveča pri težkem fizičnem delu, kajenju in pomanjkanju mesa v prehrani, zmanjša pa se pri športnih aktivnostih (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Na oksidacijo je veliko bolj občutljiva mitohondrijska kot jedrna DNA, ker ne vsebuje histonov in izrezovalnega popravljalnega sistema (Meeusen in sod., 1999).

2.4 KOVINSKI IONI IN OKSIDATIVNI STRES

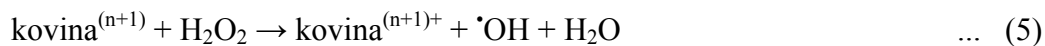
2.4.1 Kovinski ioni in oksidativni stres

Kovinski ioni, kot so železovi, cinkovi in bakrovi ioni, so nujno potrebni za normalno delovanje celic. Takšni elementi so esencialni, vendar pa lahko ima njihov presežek citotoksičen učinek, zato je zelo pomembna regulacija vsebnosti le teh. Ioni redoks aktivnih kovin tako v celici povzročajo nastanek ROS, ki lahko vodi do oksidativnega stresa in poškodb celičnih komponent (Klein in sod., 1998).

Superoksidni radikal povzroča sproščanje železa iz 4Fe-4S centrov nekaterih encimov, ki zato izgubijo aktivnost. Sproščeno železo sodeluje v Fentonovi reakciji, kjer nastajajo velike količine hidroksilnega radikala (Liochev in Fridovich, 1994; Valko in sod., 2005).

V Fentonovi reakciji sodelujejo reducirane oblike kovinskih ionov, med katerimi so najpogostejši železovi, bakrovi, kromovi ali kobaltovi ioni (Rae in sod., 1999). Kovinski ioni reagirajo z vodikovim peroksidom, pri čemer nastajajo oksidirane oblike kovinskih ionov in velike količine hidroksilnega radikala (enačba 2).

Fentonova reakcija:



Oksidirane oblike kovin, ki nastanejo pri Fentonovi reakciji pa sodelujejo v Haber-Weissovi reakciji, kjer reagirajo s superoksidnim radikalom. V reakciji nastanejo reducirane oblike kovin, ki ponovno sodelujejo v Fentonovi reakciji, kar še dodatno prispeva k nastanku hidroksilnega radikala (enačba 3) (Mager in Hohmann, 1997).

Haber-Weissova reakcija:



2.4.2 Kromovi ioni

2.4.2.1 Krom- splošno

Krom je kemijski element, ki spada v VI skupino periodnega sistema. Spada med prehodne in redoks aktivne kovine. Je visoko toksična neesencialna kovina, ki se uporablja pri proizvodnji jekla, strojenju usnja, impregniranju lesa, izdelavi zlitin in pri preprečevanju korozije. Pojavlja se kot resno okoljsko onesnažilo, njegova toksičnost v celici pa se kaže predvsem v nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti- ROS, ki vodijo do oksidativnih poškodb celičnih komponent (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.4.2.2 Kromovi (VI) in (III) ioni

Krom lahko obstaja v številnih oksidacijskih stanjih, med katerimi pa sta najpogostejši in najbolj stabilni trivalentna Cr(III) in šestvalentna Cr(VI) oblika (Cervantes in sod., 2001).

Cr(III) je esencialni element, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji krvnega nivoja glukoze. Cr(VI) je v velikih količinah potencialno genotoksičen in kancerogen (Kasprzak, 1995; Cieslak-Golonka, 1996; Shi in sod., 1994). Pri ljudeh povzroča raka na pljučih in dojkah (Kilic in sod., 2004).

Cr(VI) je najbolj toksična oblika kroma. Navadno je povezana s kisikom v kromatni (CrO_4^{2-}) ali dikromatni ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) ion. Je močan oksidant, ki se v prisotnosti organskega materiala reducira do Cr(III). Transformacija je veliko hitrejša v kislem kot v bazičnem okolju. Trivalentna oblika kroma obstaja kot oksid, hidroksid ali sulfat, večinoma pa ostaja vezana na organski material v tleh ali v vodnih raztopinah (McGrath in Smith, 1990).

Šestvalentne oblike so v okolju zaradi večje topnosti in mobilnosti bolj toksične kot trivalentne. Cr(VI) se kopiči v organizmih nato pa se preko intermediatov Cr(V) in Cr(IV) reducira do oblike Cr(III), pri čemer nastajajo toksični kisikovi radikali (Cervantes in sod., 2001; O'Brien in sod., 2001; Ackerley in sod., 2004; McGrath in Smith, 1990). Redukcija poteka v prisotnosti različnih reducentov NAD(P)H, FADH₂, pentoz in glutationa. Pri redukciji Cr(V) z glutationom, nastanejo različni kompleksi, ki reagirajo z vodikovim peroksidom v Fentonovi reakciji, kar privede do nastanka velikih količin hidroksilnega radikala (Shi in Dalal, 1990).

2.4.2.3 Transport Cr(VI) v celico

Cr(VI) se skozi membrane transportira z aktivnim transportom (Wiegand in sod., 1985). V celice kvasovk vstopa z nespecifičnim anionskim transportom (permeazni sistem), ki prenaša različne anione kot so sulfati in fosfati (Borst-Pauwels, 1981; Singler in sod., 1998). Celice so zaradi netopnosti Cr(III) večinoma neprepustne za to obliko kroma (Alcedo in sod., 1990).

2.4.2.4 Vloga kroma pri oksidativnih poškodbah

Do oksidativnih poškodb v celici tako pride zaradi izpostavitve redoks aktivnim kovinam, med katere spada tudi krom (Dayan in Paine, 2001). Krom tako kot druge redoks aktivne kovine sodeluje v Fentonovi reakciji, kjer se sproščajo velike količine prostih radikalov, ki lahko poškodujejo celične komponente (Halliwell in Gutteridge, 1999). Toksičnost kovin opazujemo z inhibicijo rasti ali s spremljanjem metabolne aktivnosti izpostavljenih mikroorganizmov (Dayan in Paine, 2001).

2.5 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI

Kvasovke, ki rastejo v aerobnih razmerah, so nenehno izpostavljene reaktivnim kisikovim zvrstem, ki nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom (Moradas- Ferreira in sod., 1996). Take spremembe v celici imajo za posledico manjšo hitrost rasti in zahtevajo hitre celične odgovore, ki so esencialni za preživetje. Molekulski mehanizmi, ki se pri tem sprožijo, so stresni odgovori (Costa in Moradas- Ferreira, 2001).

V normalnih razmerah je endogeni celični antioksidativni obrambni sistem sposoben vzdrževati količino ROS na osnovnem, neškodljivem nivoju. Prav tako lahko popravi morebitne poškodbe. Različni stresni dejavniki, med katere spadajo tudi redoks aktivne kovine, povišajo količino ROS in vodijo do sprožitve antioksidativnega obrambnega sistema. Ko količina ROS toliko naraste, da preseže antioksidativno zmogljivost, govorimo o oksidativnem stresu (Costa in Moradas- Ferreira, 2001; Jamieson in sod., 1998). Kvasne celice so tako razvile številne antioksidativne mehanizme, da se zaščitijo pred toksičnim delovanjem ROS, in sicer preko encimskih aktivnosti, z delovanjem nizkomolekularnih antioksidantov, s popravljalnimi sistemi in z odstranitvijo ROS. Nekatere izmed teh zaščit so v celici stalno prisotne, medtem ko se druge aktivirajo kot odgovor na prisoten stres (Santoro in Thiele, 1997).

2.5.1 Primarni antioksidativni obrambni sistem

Preglednica 2.1: Pregled primarnih antioksidativnih obrambnih sistemov (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Sigler in sod., 1999; Walker, 1998)

encimski obrambni sistemi	funkcija
katalaza A	razgradnja vodikovega peroksida v peroksisomu
katalaza T	razgradnja vodikovega peroksida v citosolu
Cu/Zn superoksid dismutaza	razgradnja superoksidnega radikala v vodikov peroksid in kisik v citosolu
Mn superoksid dismutaza	razgradnja superoksidnega radikala v vodikov peroksid in kisik v mitohondriju
glutation peroksidaza	redukcija vodikovega peroksida in lipidnih hidroperoksidov
glutation reduktaza	redukcija oksidirane glutationa
tioedoksin reduktaza	redukcija oksidirane tioedoksina
citokrom c peroksidaza	redukcija vodikovega peroksida
neencimski obrambni sistemi	
Glutation	odstranjuje hidroksilni radikal in singletni kisik, redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih, regeneracija nekaterih drugih antioksidantov
Tioedoksin	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
Metalotionini	zaščita celic pred kovinami
Poliamini	zaščita lipidov pred oksidacijo
Vitamini	zaščita lipidov pred oksidacijo

2.5.2 Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi

Preglednica 2.2: Pregled sekundarnih antioksidativnih obrambnih sistemov (Halliwell in Gutteridge, 1999)

popravljalni sistemi	endogeni sistem	encimi
proteinski popravljalni sistem	proteaze v proteasomu proteaze v vakuolah	endopeptidaze, aminopeptidaze, karboksipeptidaze
lipidni popravljalni sistem	lipaze	fosfolipaze, glutathion peroksidaze
DNA izrezovalni sistem	nukleotidni izrezovalni sistem	endonukleaze, eksonukleaze, DNA polimeraze, ligaze
	bazni izrezovalni sistem	DNA glikozilaza, AP ligaza, AP endonukleaze, DNA polimeraze

2.6 METODE DETEKCIJE

2.6.1 Detekcija ROS

ROS imajo pomembno vlogo v živih sistemih, saj so povezani s številnimi boleznimi. Edini tehniki, ki lahko neposredno detektirata ROS sta spektroskopija in elektronska spinska resonanca (ERS), vendar pa te metode zaradi premajhne občutljivosti ne zaznajo superoksidnega in hidroksilnega radikala, zato se večinoma uporablja pristop, kjer radikal reagira z določenimi molekulami, kar daje enega ali več stabilnih produktov, ki jih lahko izmerimo. Alternativa temu pristopu je še prstni odtis DNA, kjer pa se ne merijo reaktivne zvrsti, ampak poškodbe, ki jih te zvrsti povzročajo (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.6.2 Detekcija lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je kompleksen proces, ki se zgodi v več korakih. Poznamo nekaj tehnik, s katerimi merimo obseg peroksidacije. Ker se med lipidno peroksidacijo izgubljajo polinenasičene maščobne kisline, je najpreprostejši test merjenje izgube substrata, torej različnih maščobnih kislin. Izgubo substrata lahko merimo z GLC, HPLC ali kisikovo elektrodo.

Številne metode neposredno merijo perokside, zato jih imenujemo testi skupnih peroksidov. Med te teste prištevamo test sproščanja joda, ki meri lipidne perokside preko oksidacije I^- v I_2 . Je eden izmed najstarejših testov, večinoma pa se uporablja v živilski industriji. V to skupino testov spada tudi FOX (»ferrous oxidation xylenol orange«), ki meri spremembe v absorbanci. Peroksidi oksidirajo Fe(II) v Fe(III), kar zasledujemo s ksilenol oranžnim in merjenjem absorbance pri 560 nm.

Zaradi preproste uporabe pogosto uporabljajo tudi tiobarbiturni test, kjer vzorec izpostavimo visoki temperaturi, pri čemer nastane rožnato obarvanje, ki absorbira svetlobo pri 532 nm in fluorescira pri 553 nm. Problem pri tem testu je, da je MDA, ki ga merimo, zelo nestabilen, zato moramo biti pri pripravi vzorca zelo previdni.

Nobeden izmed testov, ki jih uporabljamo za detekcijo lipidne peroksidacije, ni dovolj dober, zato je priporočljivo, da uporabimo dva ali več različnih testov.

2.6.3 Detekcija poškodovanih proteinov

Najbolj pogosto uporabljen test za merjenje poškodb proteinov je karbonilni test. Temelji na dejstvu, da hidroksilni radikali napadajo aminokislino v proteinih (predvsem histidin, arginin, lizin in prolin), pri čemer nastanejo karbonili, ki jih lahko merimo po reakciji z 2,4-dinitrofenilhidrazinom.

V grobem ločimo dve skupini metod za detekcijo poškodovanih proteinov; v prvo skupino spadajo navadne metode, v drugo pa metode, ki zaznavajo specifične spremembe posameznih aminokislin.

Med navadne teste spada analiza aminokislin, kjer proteini hidrolizirajo, aminokislino pa ločimo z navadno ionsko izmenjevalno kromatografijo. S tem testom se meri izguba in modifikacija določenih aminokislin. Sem uvrščamo tudi test proteinskih peroksidov, ki se navadno meri jodometrično in test naraščajoče občutljivosti na proteolizo, kjer merimo nastanek alanina. Najpomembnejši test iz te skupine je že omenjeni karbonilni test.

V drugo skupino uvrščamo teste, ki z Ellmanovim reagentom merijo izgubo tiolne skupine, test s triptofanom, ki meri izgubo fluorescence ali nastanek triptofanskih oksidiranih produktov ter teste, ki merijo spremembe pri tirozinu, metioninu, fenilalaninu, valinu in argininu (Halliwell in Gutteridge, 1999).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

Potek eksperimentalnega dela prikazuje naslednja shema (Slika 3.1).

3 dni stara kultura kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 na gojišču YEPD

↓

Inokulacija v 500 ml erlenmajerice s stransko roko
s 100 ml gojišča YEPD (2x) do začetne optične gostote

0,08

↓

Aerobna submerzna kultivacija na stresalniku
preko noči do pozne logaritemske faze rasti
(T = 28 °C, 200 obr./min, OD 1,60)

↓

Prenos 45 ml bioprocesne brozge v 1000 ml erlenmajerice s stransko roko
s 405 ml gojišča YEPD (2x) in kultivacija na stresalniku do sredine
logaritemske faze rasti (OD 1,15) oz. do začetka
stacionarne faze rasti (OD 1,65) z merjenjem optične
gostote ($\lambda = 650 \text{ nm}$)

↓

OD 1,15

↓

OD 1,65

↓

Prenos 100 ml bioprocesne brozge v 500 ml erlenmajerice
s stransko roko (6x):

- 3x kontrola

- 3x izpostavitve Cr(VI) v koncentraciji 1 mM

↓

Aerobna submerzna kultivacija na stresalniku
(T = 28°C, 200 obr./min)

↓

Vzorčenje iz kontrolnih in tretiranih kultur
za določanje živosti ter poškodb proteinov in lipidov
(po določenem času: 15 minut, 1 ura, 2 uri)

Slika 3.1: Shema glavnega poskusa

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Kvasovko smo hranili na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem v inkubatorju pri 28 °C. Za poskus smo uporabljali 3 dni staro kulturo.

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 Tekoče YEPD gojišče

Tekoče YEPD gojišče smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase na stresalniku. Pripravili smo ga po sledeči recepturi:

Preglednica 3.1: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

Sestava	masa (g)
glukoza (Kemika)	20,0
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
dH ₂ O	do 1000 ml

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 120 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in ga uporabili za namnoževanje aerobne submerzne kultivacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.2.2 Trdno YEPD gojišče

Za hranjenje in precepljanje kulture kvasovk smo uporabljali trdno YEPD gojišče.

Preglednica 3.2: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

Sestava	masa (g)
glukoza (Kemika)	20,0
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
agar (Biolife)	20,0
dH ₂ O	do 1000 ml

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri 120 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in ga aseptično razlili v petrijeve plošče.

3.2.3 Reagenti in raztopine

Pri eksperimentalnem delu smo potrebovali številne raztopine in reagente, ki so razvrščeni glede na posamezne metode:

3.2.3.1 Izpostavitve celic kvasovk Cr(VI)

- **100 mM izhodna raztopina Cr(VI) ionov**

Zatehtali smo 1,47 g trdnega K₂Cr₂O₇ (Sigma) in dolili destilirano vodo do 100 ml. Raztopino smo hranili v infuzijski steklenički ovito v alu folijo na sobni temperaturi.

3.2.3.2 Štetje celic

- **0,9 % raztopina NaCl (fiziološka raztopina)**

Zatehtali smo 2,13 g trdnega NaCl (Merck) in dolili destilirano vodo do 250 ml. Raztopino smo po 9 ml razdelili v steklene epruvete, avtoklavirali in hranili na sobni temperaturi.

3.2.3.3 Določanje živosti celic

- **10x PBS pufer**

V čaši smo zatehtali 1,09 g trdnega brezvodnega Na_2HPO_4 (Merck), 0,42 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) in 9 g NaCl (Merck). Dolili smo destilirano vodo do končnega volumna 100 ml. S HCl smo pH uravnali na 7,2. Pufer smo nato filtrirali in ga hranili v infuzijski steklenici v hladilniku.

1x PBS pufer (v nadaljevanju PBS pufer) smo razredčili, ga filtrirali in hranili v hladilniku.

- **Komplet: LIVE/DEAD[®] Funga Light[™] Yeast Viability Kit (Molecular Probes)**

· barvilo SYTO[®] 9: 3,34 mM, raztopina v DMSO

· barvilo Propidium iodide: 20 mM, raztopina v DMSO

Komplet smo hranili pri $T = -20\text{ °C}$.

3.2.3.4 Določanje oksidativnih poškodb proteinov

- **50 mM NaK fosfatni pufer z 0,1 mM etilen diamino tetraocetno kislino (EDTA) (Kemika)**

V čašo smo zatehtali 3,55 g bazičnega Na_2HPO_4 in mu dodali 0,019 g EDTA ter dolili destilirano vodo do 0,5 l. V drugo čašo smo zatehtali 3,40 g kislega KH_2PO_4 in mu dodali 0,019 g EDTA ter destilirano vodo do končnega volumna 0,5 l. Nato

smo bazičnemu pufru dodajali kislega, da je pH padel na 7. Pufer smo hranili v infuzijski steklenici v hladilniku.

- **10 mM raztopina 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNFH) (Merck) v 2 M HCl**
Zatehtali smo 0,075 g 2,4- DNFH in ga raztopili v 25 ml 2 M HCl. Raztopino smo hranili na sobni temperaturi v temi.
- **20 % (w/v) raztopina trikloroocetne kisline (TCA) (Merck)**
Zatehtali smo 5 g trdnega TCA in dodali destilirano vodo do 25 ml. Raztopino smo hranili v hladilniku.
- **6 M raztopina gvanidin klorida (GC) (Merck) v 2 mM KH₂PO₄**
Zatehtali smo 14,3 g trdnega GC in ga raztopili v kalijevem pufru do končnega volumna 25 ml. Raztopino smo hranili na sobni temperaturi.
- **inhibitor proteaz (Roche Diagnostic GMBN)**
- **reagent Biorad prot. assay (Bio-Rad)**
- **etanol (Merck)**
- **etilacetat (Merck)**

3.2.3.5 Določanje oksidativnih poškodb lipidov

- **raztopina (15 % (w/v) TCA, 0,37 % (w/v) TBA, 0,25 M HCl in 0,01 % (w/v) BTH)**
V čašo smo zatehtali 15 g trikloroocetne kisline (TCA), 0,37 g tiobarbiturne kisline (TBA) (Sigma), 25 ml 1 M HCl in 0,01 g butil hidroksiltoluena (BTH) (Sigma), premešali ter dolili destilirano vodo do končnega volumna 100 ml. Raztopino smo hranili v stekleni bučki na sobni temperaturi.
- **1- butanol (Merck)**

3.2.4 Oprema

Steklovina in potrošni material:

- centrifugirke (1,5 ml, 2ml, 12 ml, 50 ml)
- cepilne zanke (Bioster)
- cirkonij- kremenčeve kroglice (premer 0,5 mm; Biospec Products)
- čaše
- infuzijske steklenice za 50 ml, 150 ml, 500 ml
- kovinske žličke
- merilne bučke
- merilni valji
- 96-mestne mikrotiterske ploščice za merjenje absorbance in fluorescence (Nunc)
- UV-STAR® 96- mestne mikrotiterske ploščice za merjenje absorbance (Greiner)
- nastavki za pipeto
- parafilm
- petrijeve plošče (Golias)
- sterilni membranski filtri s premerom por 0,45 µm (Sartorius)
- števna ploščica Bürker-Türk (Brand)
- 500 ml erlenmajerice s stransko roko (Shott Duran in Borosilicate)
- 1000 ml erlenmajerice s stransko roko (Shott Duran)

Aparature:

- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatske pipete (Gilson)
- brezprašna komora (Iskra PIO SMBC 122)
- centrifuge (Eppendorf 5415C, Tehtnica Železniki Centric 322A)
- čitalec mikrotiterskih plošč Safire II (Tecan)
- digestorij
- hladilnik (LTH)
- inkubator (I-50 VPC, Kambič)
- magnetno mešalo (Tehtnica Železniki 550 M)

- magnetki
- mikroskop (Leica ATC 2000)
- naprava za filtriranje (Sartorius)
- pH meter (Mettler Toledo)
- rotacijski stresalnik (Tehtnica Železniki)
- spektrofotometer za merjenje optične gostote (Iskra MA 9520)
- spektrofotometer (Tecan) (Pharmacia Biotech ultraspec 2000)
- sušilnik (Sutjeska)
- tehtnica (Sartorius analytic)
- tehtnica (Sartorius excellence)
- vodna kopel (Labnet International)
- vrtinčnik VIBROMIX 104 EV (Tehtnica Železniki)
- zamrzovalna omara - 80 °C (Heto)
- zamrzovalna skrinja (Gorenje)

Programska oprema

- Magellan (Tecan)

3.3 METODE

3.3.1 Priprava in ohranjanje kulture kvasovk

Kulturo smo dvakrat tedensko precepljali na 3 sterilne plošče s trdnim YEPD gojiščem. Plošče smo po treh dneh kultivacije na 28 °C uporabili za inokulacijo tekočega YEPD gojišča in za nadaljnja precepljanja.

3.3.2 Priprava inokuluma

Tri dni staro kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo s cepilno zanko prenesli v 100 ml tekočega YEPD gojišča, ki smo ga pripravili v 500 ml erlenmajericah s stransko roko. Začetna optična gostota pri 650 nm je znašala okoli 0,08. Dodali smo protipenilec, da se je kultura kvasovk manj penila, s tem pa smo zagotovili tudi enakomernejši vnos kisika. Erlenmajerice smo čez noč kultivirali na stresalniku pri 28 °C in 200 obr./min do pozne logaritemske faze rasti (optična gostota 1,60).

3.3.3 Aerobna submerzna kultivacija- glavni poskus

Ko se je inokulum kvasovk dovolj namnožil (optična gostota 1,60), smo z merilnim valjem odvzeli 45 ml bioprocesne brozge. To smo inokulirali v 405 ml gojišča YEPD v 1000 ml erlenmajerici s stransko roko, tako da je inokulum predstavljal 10 volumskih odstotkov. Erlenmajerice smo ponovno kultivirali na stresalniku pri 28 °C in 200 obr./min. Redno smo spremljali naraščanje optične gostote, podatki pa so nam služili za rastno krivuljo. Na sredini logaritemske faze rasti pri optični gostoti 1,15 oz. na začetku stacionarne faze rasti pri optični gostoti 1,65, smo prekinili kultivacijo in nadaljevali z obdelavo kulture kvasovk s Cr (VI) ioni.

3.3.4 Izpostavitev celic kvasovk Cr(VI)

Pri optični gostoti 1,15 oz. 1,65 smo prekinili kultivacijo in odvzeli 6 krat po 100 ml brozge, ki smo jo prenesli v nove 500 ml erlenmajerice s stransko roko. V tri erlenmajerice smo dodali 1 ml 100 mM izhodne raztopine Cr(VI), preostale tri pa so nam služile za kontrolo. V vseh erlenmajericah smo pustili rasti kulturo na stresalniku pri 28 °C in 200 obr./min. Po 15 minutah, 1 uri in 2 urah smo jemali vzorce po 1 ml za določanje živosti in 2 krat po 25 ml (poskus v sredini eksponentne faze rasti) oz. 2 krat po 12,5 ml (poskus v začetku stacionarne faze rasti) za določanje oksidativnih poškodb proteinov in lipidov. Vzorce za določanje poškodb proteinov in lipidov smo centrifugirali in sprali z NaK fosfatnim pufrom in ponovno centrifugirali. Vzorce smo do analiz hranili v plastičnih 50 ml centrifugirkah v zamrzovalniku na - 80 °C.

3.3.5 Določanje živosti

Živost celic smo določali s pomočjo komercialnega kompleta, ki vsebuje dve barvili, SYTO® 9 in propidijev jodid (Haugland, 2002). Ta komplet nam omogoča hitro in enostavno kvantifikacijo živih in mrtvih kvasnih celic.

1 ml bioprocene brozge smo najprej 5 minut centrifugirali pri 11000 obr./min. Supernatant smo odlili in sediment sprali z 1 ml filtriranega PBS pufru ter premešali na vrtinčniku. Ponovno smo centrifugirali pri enakih pogojih, odlili supernatant in dodali 1 ml pufru in tako pripravili celično suspenzijo v pufru. Med tem časom smo prešteli celice, saj smo za izvedbo testa potrebovali suspenzijo celic s koncentracijo $1 \cdot 10^6$ celic/ml. Naslednji korak je tako obsegal pripravo 100 kratne razredčine, kjer smo v nove Eppendorf centrifugirke 990 µl filtriranega PBS pufru dodali 10 µl pripravljene celične suspenzije. 1 ml take suspenzije smo nato dodali 1 µl barvila SYTO® 9 in 1 µl propidijevega jodida ter dobro premešali. Centrifugirke smo inkubirali v temi pri 37 °C za 25 minut. Vsakih 5 minut smo suspenzijo premešali. Po končani inkubaciji smo suspenzijo ponovno premešali in 200 µl nanesli na mikrotiterske ploščice, kjer smo s čitalcem mikrotiterskih plošč Safire II izmerili fluorescenco. Valovni dolžini vzbujanja in emisije se pri barvilih razlikujeta;

tako je pri barvilu SYTO[®] 9 valovna dolžina vzbujanja 488 nm, emisije pa 530 nm, pri barvilu propidijev jodid pa valovna dolžina vzbujanja 488 nm, emisije pa 650 nm.

Barvilo SYTO[®] 9 detektira poškodovane in intaktne celice in prodre do nukleinskih kislin, s katerimi ustvari kompleks, ki fluorescira, medtem ko pa propidijev jodid barva samo poškodovane celice, saj lahko prehaja le preko poškodovane membrane.

Barvili smo dobili kot raztopino v dimetil sulfoksidu (DMSO), ki ščiti barvili pred izgubo aktivnosti. Pri delu je potrebna previdnost, saj je propidijev jodid potencialno mutagen, medtem ko za drugo barvilo tega podatka nismo dobili.

Barvili smo hranili v zamrzovalniku na - 20 °C, pred uporabo pa smo ju odtajali na sobni temperaturi. Barvili smo hranili zaščiteni pred svetlobo.

3.3.6 Določanje oksidativnih poškodb proteinov

Za določanje oksidativnih poškodb proteinov smo uporabili spektrofotometrično metodo. Določali smo tvorbo karbonilov z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 360 nm (Adams in sod., 2001, Levine in sod., 1994).

Postopek obsega več korakov:

- priprava celičnega ekstrakta
- določanje koncentracije proteinov
- določanje karbonilov

Zamrznjeno biomaso (točka 3.3.4) smo odtajali na ledu in ji dodali 500 µl 50 mM NaK fosfatnega pufra z 0,1 M EDTA ter resuspendirali. Suspenzijo smo prenesli v nove 2 ml Eppendorf centrifugirke, v katere smo predhodno dodali inhibitor proteaz. Dodali smo cirkonij-kremenčeve kroglice za razbijanje celic, kjer smo centrifugirke 1 minuto mešali na vrtinčniku, 1 minuto pa jih inkubirali na ledu. Postopek smo petkrat ponovili in nato 15 minut centrifugirali v hladni sobi pri 14000 obr./min. Celični ekstrakt smo odpipetirali v nove Eppendorf centrifugirke.

Sledilo je določanje koncentracije proteinov po Bradfordu, kjer smo 2,5 ml petkrat redčenemu reagentu Biorad »protein assay« dodali 10 µl ekstrakta in 40 µl NaK fosfatnega pufra z EDTA ter premešali. Pomerili smo tudi slepi vzorec, kjer smo reagentu dodali le 50 µl NaK fosfatnega pufra z EDTA. Vzorce smo 5 minut inkubirali, nato pa 200 µl nanесли

na mikrotiterske ploščice. Merili smo absorbanco pri valovni dolžini 595 nm in nato na podlagi umeritvene krivulje (priloga A) določili koncentracijo proteinov v ekstraktu.

Za določanje karbonilov smo 300 μ l ekstrakta prenesli v nove 2 ml Eppendorf centrifugirke in dodali 300 μ l hladne 20 % (w/v) raztopine TCA in na hitro premešali. Centrifugirke smo za 10 minut postavili na led in jih nato 3 minute centrifugirali pri 11000 obr./min. Supernatant smo odpipetirali in sedimentu dodali 500 μ l 10 mM raztopine DNFH. To smo dali za 1 uro stresat na vrtničnik. Po 1 uri smo dodali 500 μ l 20 % raztopine TCA in 3 minute centrifugirali. Sediment smo spirali z 1 ml etanol-etilacetata v razmerju 1:1, pustili stati za 10 minut na sobni temperaturi in ponovno centrifugirali (5 min, 11000 obr./min). Postopek smo še dvakrat ponovili. Po izpiranju smo dodali še 1 ml 6 M raztopine GC in za 15 minut inkubirali pri 37 °C. Še zadnjič smo 3 minute centrifugirali (tokrat 6000 obr./min) in 200 μ l nanесли na mikrotitersko ploščico. Izmerili smo absorbanco pri valovni dolžini 360 nm.

Rezultate smo izrazili kot $A_{360}/m_{\text{prot. celičnega ekstrakta}}$

3.3.7 Določanje poškodb lipidov

Poškodbe lipidov smo določali po metodi TBA, ki temelji na kislinski razgradnji lipidnih hidroperoksidov v malondialdehid (MDA). Ta reagira s tiobarbiturno kislino, da nastane rdeč produkt, ki mu izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 535 nm (Ortega- Villasante in sod., 2005) ali fluorescenco (Nguyen-nhu in Knoop, 2002).

Postopek obsega 2 koraka:

- določanje malondialdehidov
- določanje suhe biomase

Zamrznjeno biomaso (točka 3.3.4) smo najprej odtajali na ledu in ji dodali 500 μ l raztopine 15 % (w/v) TCA, 0,37 % (w/v) TBA, 0,25 M HCl, 0,01 % (w/v) BTH. Raztopina vsebuje kislini TCA in HCl, ki razgradita hidroperokside do malondialdehida, TBA, ki ustvari kompleks z malondialdehidom, kompleksu pa kasneje izmerimo fluorescenco in pa BTH, ki služi kot antioksidant, saj prepreči nastanek novih malondialdehidov, tako da imamo v vzorcu samo poškodbe lipidov, ki so nastale zaradi delovanja Cr(VI).

Biomaso z raztopino TCA, TBA, HCl in BTH smo prenesli v 2 ml Eppendorf centrifugirke in jim dodali sterilne cirkonij kremenčeve kroglice za razbijanje celic. Ponovno smo 1 minuto mešali na vrtničniku in 1 minuto inkubirali na ledu, postopek pa pet krat ponovili. Centrifugirke smo nato močno oblepili z avtoklavirnim trakom in parafilmom in jih za 30 minut dali v vodno kopel na 90 °C. Centrifugirke smo prenesli na led, kjer smo jih ohlajali in jim nato dodali 700 µl 1-butanola ter premešali. V hladni sobi smo 10 minut centrifugirali pri 14000 obr./min, nanесли 200 µl zgornje plasi na mikrotitersko ploščico in izmerili fluorescenco pri valovni dolžini vzbujanja 515 nm in valovni dolžini emisije 555 nm.

Ker smo pri računanju lipidne peroksidacije potrebovali podatek za suho biomaso, smo v posebnem poskusu izvedli tudi to. Stehtali smo prazne steklene centrifugirke, namnožili inokulum, nadaljevali z gojitvijo kulture (posebej za eksponentno in stacionarno fazo) ter obdelali celice s Cr(VI). Po 15 minutah, eni in dveh urah smo v stehtane steklene centrifugirke vzeli po 4 ml vzorca, centrifugirali, biomaso sprali z destilirano vodo in dali za 2 uri v sušilnik na T= 105 °C. Po 2 urah smo steklene centrifugirke prenesli v eksikator, kjer smo jih pustili preko noči. Naslednji dan smo stehtali steklene centrifugirke in jim odšteli maso praznih centrifugirk.

Rezultate smo izrazili kot: $F / m_{\text{suhe biomase}}$

3.3.8 Statistična obdelava podatkov

Vse zgoraj opisane metode smo izvedli v več ponovitvah, rezultate meritev pa smo podali kot povprečna vrednost \bar{X} s pripadajočim standardnim odklonom (SD). Povprečno vrednost in standardni odklon smo izračunali v programu Microsoft Excel (Košmelj, 2001).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots (7)$$

n- število meritev; X_i - vrednost i-te meritve

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \dots (8)$$

Napravili smo tudi statistično analizo, kjer smo v poskusu zbrane podatke pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) z multiplo analizo variance – postopkom GLM (General Linear Models).

Statistični model za pokazatelje oksidativnih poškodb proteinov in lipidov je vseboval vpliv tretiranja. Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo testa LSM in so primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

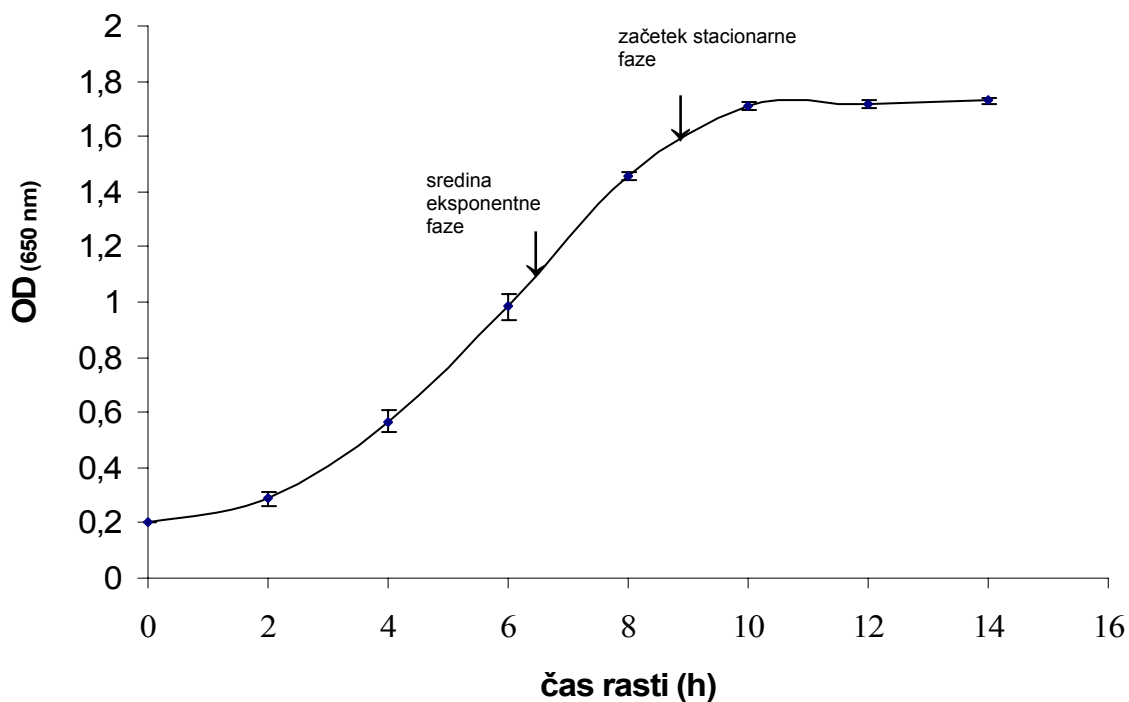
V hipotezi trdimo, da izpostavljenost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* Cr(VI) ionom v določenih koncentracijah povzroči tvorbo karbonilov in peroksidacijo lipidov.

Kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 smo v sredini eksponentne in na začetku stacionarne faze rasti izpostavili določeni koncentraciji Cr(VI) ter v različnih časovnih presledkih spremljali živost ter preko dinamike nastajanja karbonilov in malondialdehidov skleпали na poškodbe proteinov in lipidov.

Predstavljamo rezultate, ki smo jih dobili v raziskavah na Katedri za biotehnologijo med 5. marcem in 31. avgustom 2007.

4.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE KVASOVKE

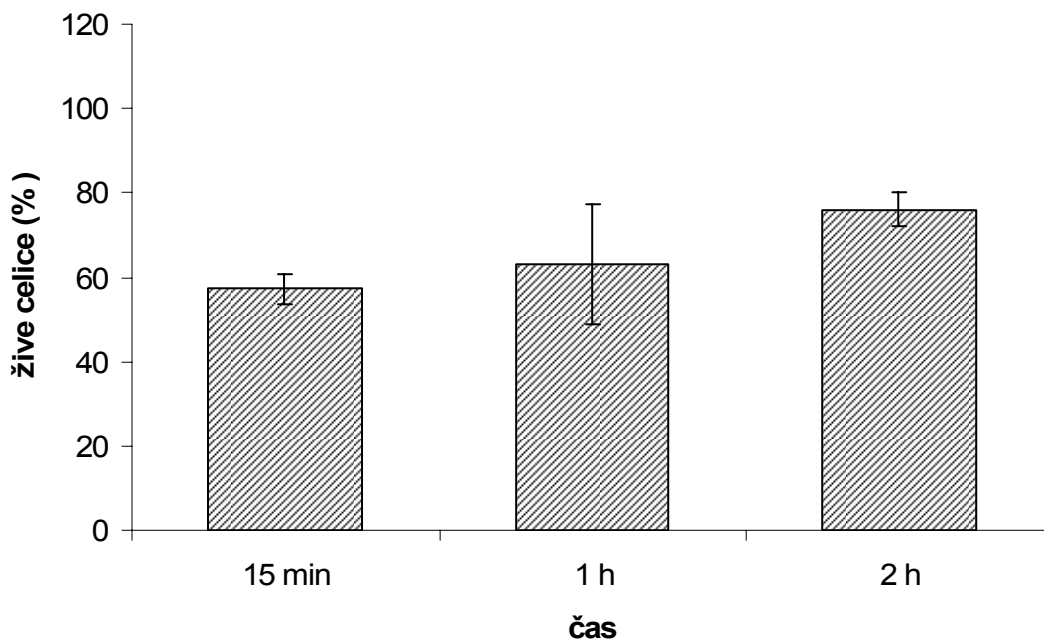
Saccharomyces cerevisiae



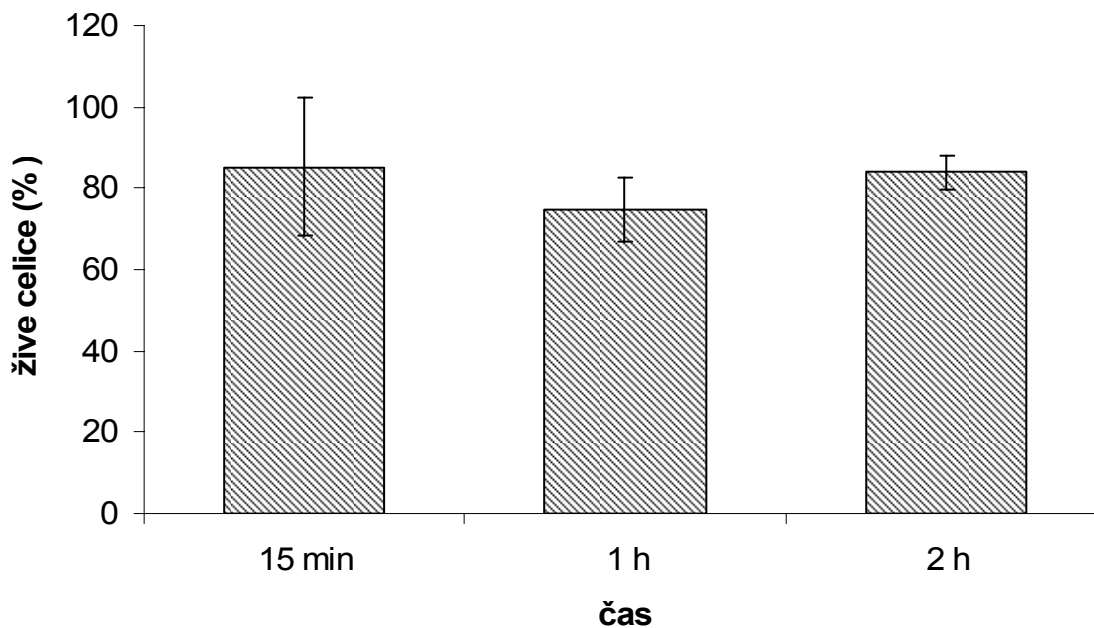
Slika 4.1: Rastna krivulja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ($T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr./min)
Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev \pm SD.

Na podlagi rastne krivulje smo določili sredino eksponentne faze, kjer optična gostota doseže vrednost 1,15 in začetek stacionarne faze, kjer je optična gostota 1,65. Celice smo v sredini eksponentne in na začetku stacionarne faze rasti izpostavili Cr(VI) ionom.

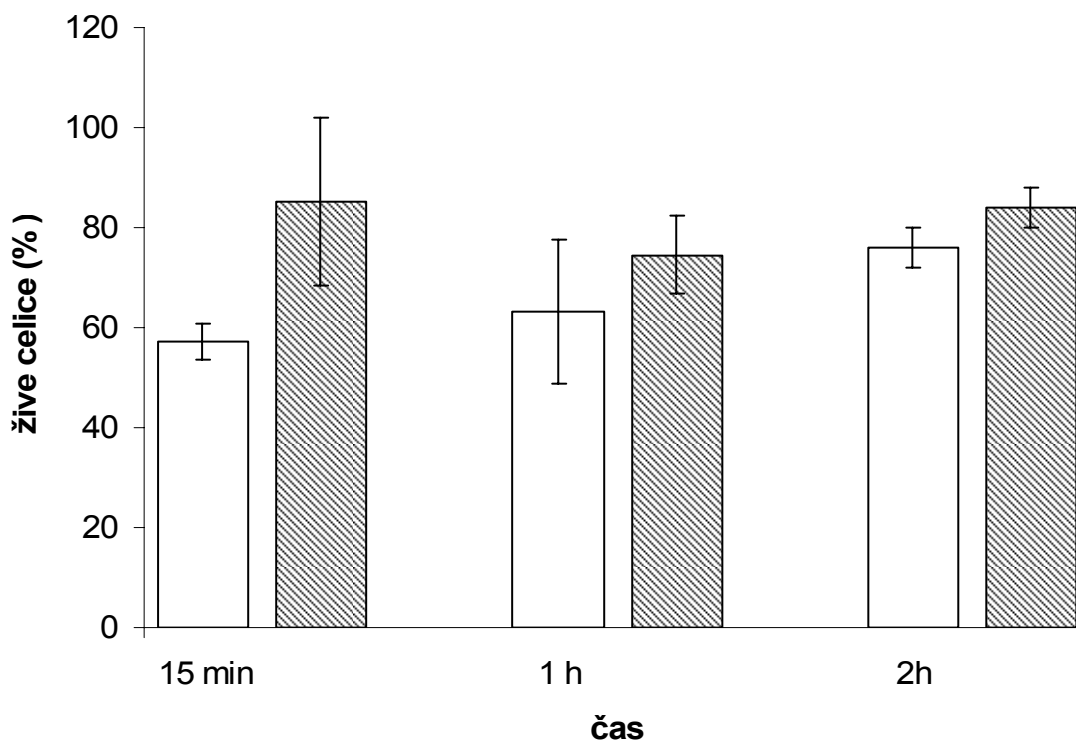
4.2 DOLOČANJE ŽIVOSTI KVASOVKE



Slika 4.2: Živost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* pri treh različnih časih glede na kontrolo po izpostavitvi stresane kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 v sredini eksponentne faze rasti 1mM Cr(VI) (gojišče YEPD, T= 28 °C, 200 obr./min). Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost štirih ponovitev \pm SD.



Slika 4.3: Živost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v treh različnih časih glede na kontrolo po izpostavitvi stresane kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 na začetku stacionarne faze rasti. 1mM Cr(VI) (gojišče YEPD, T= 28 °C, 200 obr./min) Rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih ponovitev \pm SD.

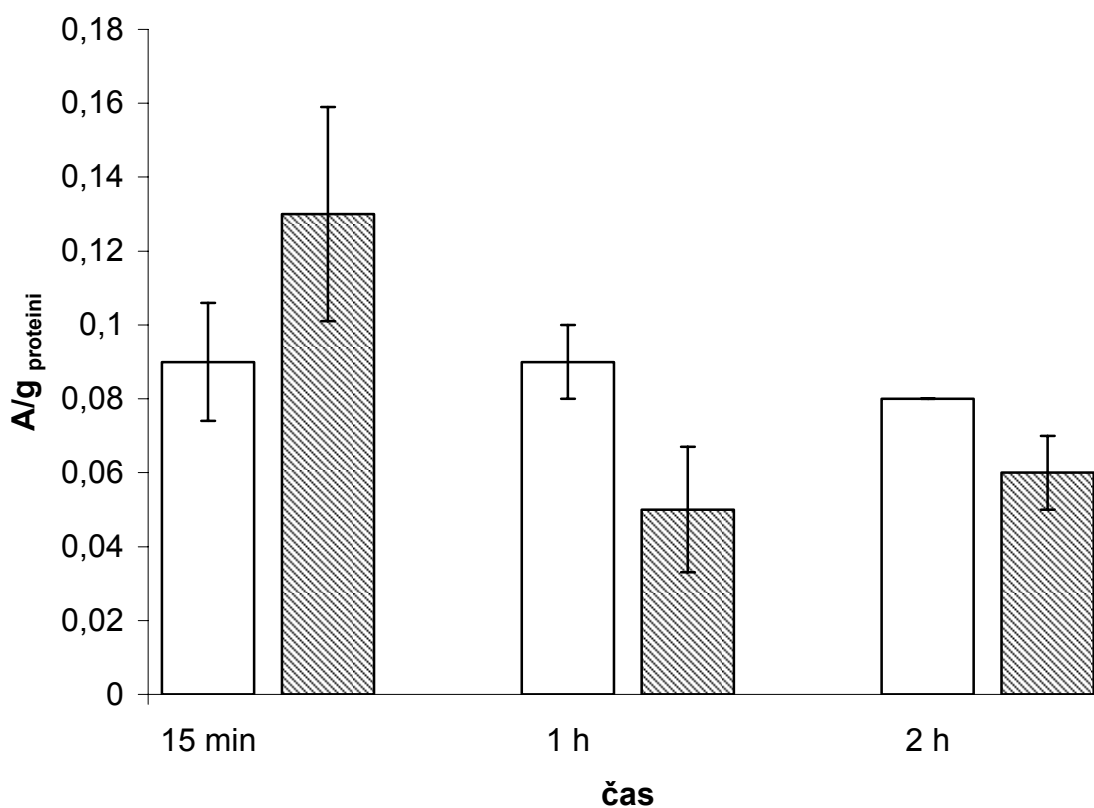


Slika 4.4: Primerjava živosti celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v sredini eksponentne (bela) in na začetku stacionarne faze rasti (črna).

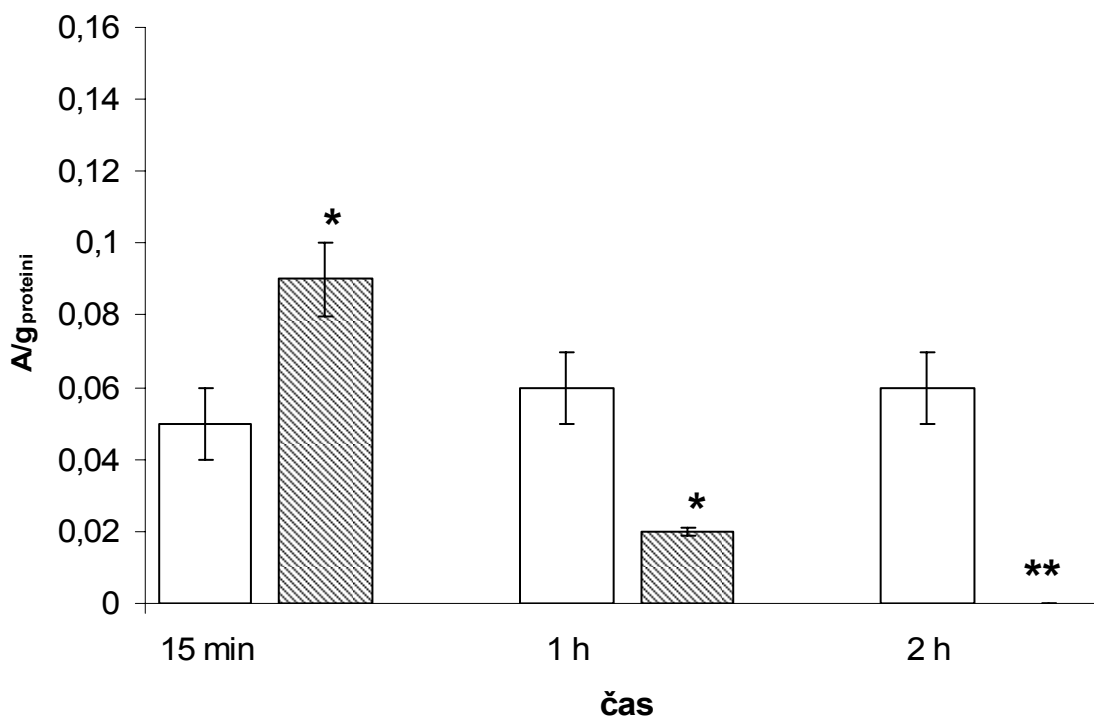
Po 15-minutni izpostavitvi Cr(VI) v eksponentni fazi rasti smo zaznali padec živosti, saj smo v izpostavljenem vzorcu izmerili slabih 60 odstotkov živih celic glede na kontrolo, kar je tudi razvidno s slike 4.2. Odstotek živih celic po 1 uri je nekoliko višji, po 2 urah izpostavitve pa doseže že 76 odstotkov. Po 15 minutah tretiranja s Cr(VI) ioni na začetku stacionarne faze rasti smo v vzorcu imeli čez 80 odstotkov živih celic, odstotek je v naslednji uri nekoliko padel, nato pa ponovno presegel 80 odstotkov (slika 4.3). Torej so celice v stacionarni fazi rasti bolj odporne na stresne dejavnike kakor celice v eksponentni fazi rasti, saj je živost v stacionarni fazi rasti višja kot v eksponentni.

4.3 DOLOČANJE OKSIDATIVNIH POŠKODB PROTEINOV

Določali smo vsebnost karbonilov.



Slika 4.5: Primerjava vsebnosti karbonilov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) po izpostavitvi Cr(VI) v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *S. cerevisiae* (T=28 °C, 200 obr./min). Rezultati so podani kot povprečna vrednost štirih ponovitev \pm SD.



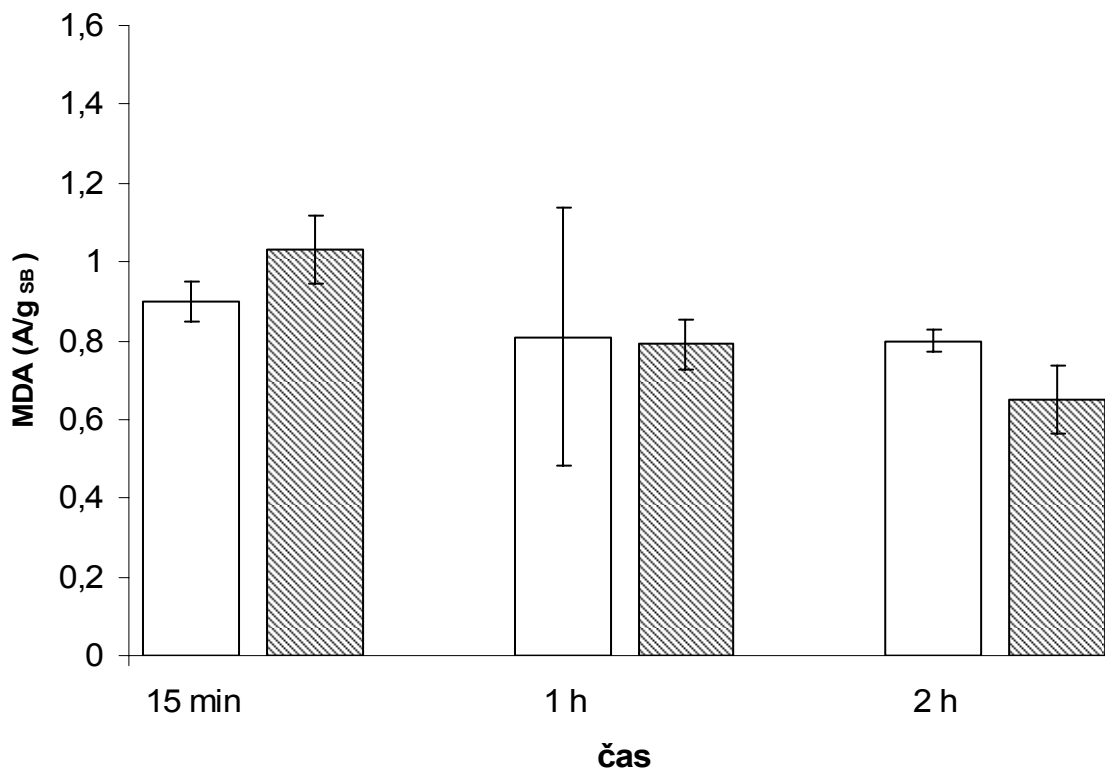
Slika 4.6: Primerjava vsebnosti karbonilov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) na začetku stacionarne faze rasti stresane kulture kvasovke *S. cerevisiae* ($T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr./min). Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost štirih ponovitev \pm SD. Opomba: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Vsebnost karbonilov pri kontroli je razmeroma konstantna, medtem ko smo na začetku stacionarne faze rasti zaznali nekoliko nižjo vsebnost karbonilov kakor v eksponentni fazi rasti, kar ponovno kaže na bolj odporne celice v stacionarni fazi rasti.

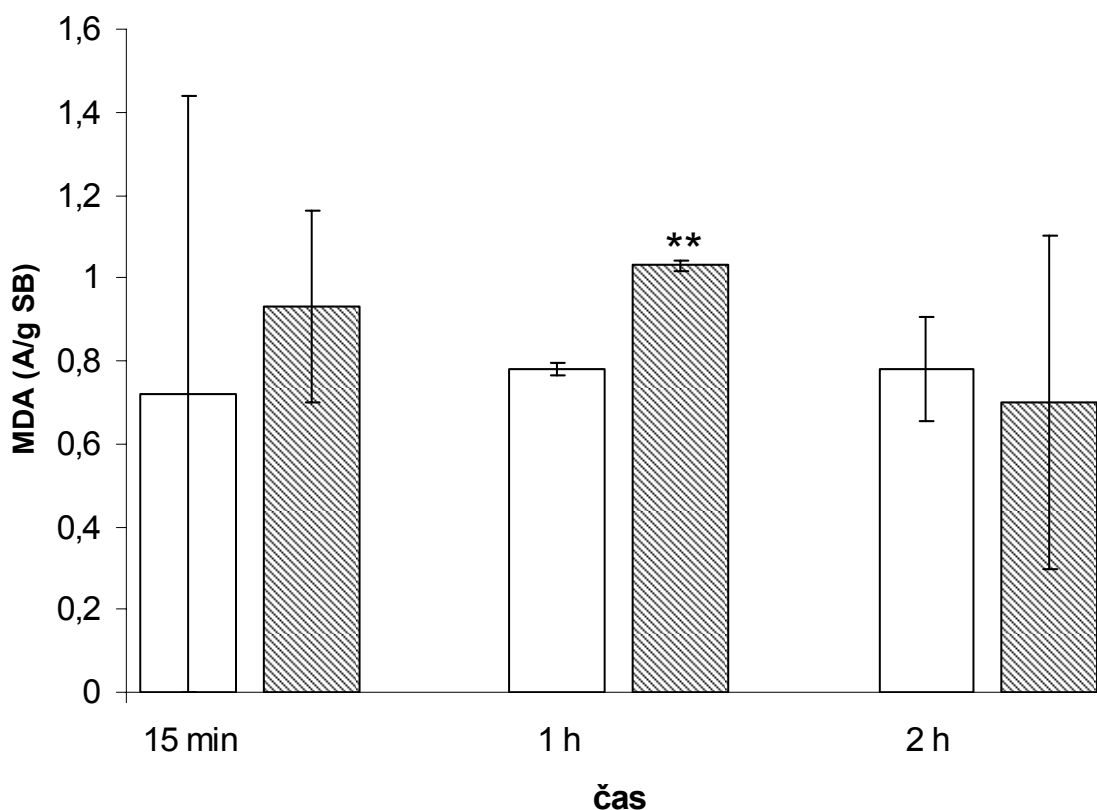
Vzorec v eksponentni fazi rasti je imel po 15 minutah najvišjo izmerjeno vsebnost karbonilov, vendar po 1 uri pade, po dveh urah pa je vsebnost karbonilov le znatno višja kakor po 1 uri. Vzorec v stacionarni fazi rasti je imel po 15 minutah manjšo izmerjeno vsebnost karbonilov kot vzorec v eksponentni fazi, po 1 uri je vsebnost karbonilov močno padla, po 2 urah pa se je vsebnost karbonilov zmanjšala pod mejo detekcije. Vsi rezultati v stacionarni fazi rasti so statistično značilni.

4.4 DOLOČANJE OKSIDATIVNIH POŠKODB LIPIDOV

Določali smo vsebnost malondialdehidov.



Slika 4.7: Primerjava vsebnosti malondialdehidov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) po izpostavitvi Cr(VI) v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *S. cerevisiae* ($T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr./min). Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost štirih ponovitev \pm SD.



Slika 4.8: Primerjava vsebnosti malondialdehidov med kontrolo (bela) in izpostavljenim vzorcem (črna) po izpostavitvi Cr(VI) na začetku stacionarne faze rasti kvasovke *S. cerevisiae* ($T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr./min). Rezultati so prikazani kakor povprečna vrednost štirih ponovitev \pm SD.

Tudi pri izpostavljenih vzorcih smo najvišje izmerjene vrednosti izmerili v eksponentni fazi rasti po 15 minutah, nato se vsebnost malondialdehidov, značilnih za poškodbe lipidov, po 1 uri nekoliko zmanjša ter se še nekoliko zmanjša po 2 urah izpostavitve (slika 4.7). Pri vzorcih v stacionarni fazi rasti po 15 minutah in 1 uri ni bistvene razlike, po 2 urah pa smo v vzorcu zaznali že manj poškodb kot v istem času pri kontrolnem vzorcu, vendar pa takšnega izboljšanja kot pri poškodbah proteinov nismo zaznali (slika 4.8). Edina statistično značilna sprememba pri merjenju peroksidacije lipidov je bila po 1 uri izpostavitve in sicer v stacionarni fazi rasti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Izhajali smo iz delovne hipoteze, ki pravi, da izpostavljenost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* Cr(VI) ionom v določenih koncentracijah povzroči nastanek karbonilov in peroksidacijo lipidov.

5.1 RAZPRAVA

Cr(VI) sodi med redoks aktivne kovine, ki igrajo pomembno vlogo pri produkciji ROS v celicah (Jamnik in Raspor, 2003). Reducirane oblike kovinskih ionov sodelujejo v Fentonovi reakciji, kjer reagirajo z vodikovim peroksidom, pri tem pa nastajajo oksidirane oblike kovinskih ionov in velike količine hidroksilnega radikala. Oksidirane oblike kovinskih ionov sodelujejo v Haber-Weissovi reakciji, kjer se ponovno sprostijo reducirane oblike kovinskih ionov, le ti pa se ponovno vključijo v Fentonovo reakcijo in še dodatno povečajo nastanek hidroksilnega radikala (Mager in Hohmann, 1997). Prav hidroksilni radikal predstavlja večino od zvrsti, ki so odgovorne za oksidacijo in s tem poškodbe celičnih komponent DNA, proteinov in lipidov. Pri proteinih povzročajo najbolj izrazite poškodbe, kjer nastajajo karbonili (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Pri lipidih je hidroksilni radikal vključen v fazo iniciacije, kjer odvzame vodikov atom iz lipida, kar v nadaljnjih postopkih privede do nastanka malondialdehidov (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Redukcija Cr(VI) z znotrajceličnimi reducenti (NAD(P)H, FADH₂, pentoze, itd.) vodi do oksidativnega stresa in predstavlja pomemben korak v kancerogenosti (De Flora in Wetterhahn, 1989, Cohen, 1993). V procesu redukcije v celici nastanejo Cr(V) kompleksi, ki reagirajo z vodikovim peroksidom, pri čemer nastaja v Fentonovi reakciji zelo škodljiv hidroksilni radikal (Stohs in Bagchi, 1995; Cervantes in sod. 2001). Znotrajcelična redukcija Cr(VI) obdrži citoplazemsko koncentracijo Cr(VI) nizko, zunajcelični Cr(VI) pa lahko difundira v celice s koncentracijskim gradientom (Arslan in sod., 1987). Končni produkt redukcije je Cr(III), ki se po nekaj urah začne kopičiti v celicah, kjer se poveže v komplekse z DNA, reagira s karboksilnimi in sulfhidrilnimi skupinami encimov ter s tem

povzroča spremembe v njihovi strukturi in aktivnosti (Zhitkovich in sod., 1996; Mattagasingh in Misra, 1999; Levis in Bianchi, 1982).

Arslan in sod. (1987) trdijo, da se aktivnost obrambnih encimov po 4 urah tretiranja s Cr(VI) zmanjša, kar je posledica naraščajoče akumulacije Cr(III), lahko pa je to posledica kopičenja oksidativno poškodovanih molekul, kot trdijo Sigler in sod. (1999).

Celice kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki so bile v sredini sredini eksponentne faze in v začetku stacionarne faze rasti, smo izpostavili 1 mM koncentraciji Cr(VI) ionov in preverili njihov vpliv na živost in nastajanje oksidativnih poškodb proteinov in lipidov, in sicer 15 minut, 1 uro in 2 uri po dodatku Cr(VI).

5.1.1 Vpliv Cr(VI) ionov na živost celic kvasovk

Živost celic se je po dodatku Cr(VI) zmanjšala, vendar so celice bolj odporne v stacionarni fazi rasti v primerjavi z eksponentno, kjer smo v 2-h izpostavitvi izmerili 30 - 40 % padec živosti glede na kontrolo. V stacionarni fazi rasti pa smo zaznali padec od 15 do 25 % glede na kontrolo (slika 4.4). Rezultati potrjujejo že znano dejstvo, da so endogeni antioksidativni obrambni sistemi, tako primarni kot sekundarni, veliko bolj učinkoviti v stacionarni fazi rasti (Sigler in sod., 1999), kar se kaže v večji odpornosti celic v stacionarni fazi rasti.

5.1.2 Vpliv Cr(VI) ionov na vsebnost karbonilov

Za določanje oksidativnih poškodb proteinov smo uporabili spektrofotometrično metodo pri kateri smo z merjenjem absorbance merili vsebnost karbonilov. Metoda temelji na reakciji med dinitrofenilhidrazinom in karbonili (Adams in sod., 2001, Levine in sod., 1994).

S kovinami katalizirana oksidacija in tvorba karbonilov je hitra. Adams in sod. (2001) navajajo porast karbonilov že 15 min po dodatku oksidanta (0,2mM CuSO₄ in vodikov peroksid), višek pa se doseže okoli 120 minute. Toksičnost kroma je povezana z oksidacijo proteinov, kar se sklada z dejstvom, da daje izpostavitvev kromovim ionom približno 20-kratno povečanje karbonilov, medtem ko pa izpostavitvev bakrovim ionom daje le 8- ali manj kratno povečanje, oboje v koncentracijah, ki so skoraj smrtne (Shanmuganathan in sod., 2004). Tvorba karbonilov je odvisna od koncentracije in časa delovanja oksidanta (Adams in sod., 2001).

Po dodatku Cr(VI) tako v sredini eksponentne faze kot tudi na začetku stacionarne faze rasti smo po 15 minutah izmerili porast vsebnosti karbonilov glede na kontrolo. Po 1 in 2 urah od dodatka Cr(VI) pa je bila vsebnost nižja v primerjavi s kontrolo, kar je bilo statistično značilno le v stacionarni fazi rasti (slika 4.6). To nakazuje na indukcijo sekundarnih antioksidativnih obrambnih sistemov, v tem primeru sistema za odstranjevanje oksidativno poškodovanih proteinov, za katerega velja, da je bolj učinkovit v stacionarni fazi rasti (Dowds in sod., 1987; Sigler in sod., 1999), ko se v nerastočih celicah poveča produkcija ROS. Celice v stacionarni fazi rasti so trajno izpostavljene ROS, ki ves čas napadajo posamezno celico, brstenje celic pa več ne poteka (Goldberg in St. John, 1976; Liu in sod., 1984). V našem primeru pa k dodatnemu dvigu ROS prispeva še Cr(VI). Učinkovitejše odstranjevanje oksidativno poškodovanih proteinov v primerjavi z eksponentno fazo rasti in posledično hitrejši proteinski obrat se kaže tudi v večji odpornosti celic v stacionarni fazi rasti na Cr(VI) (slika 4.5, 4.6). Podobno navajajo tudi Grune in sod. (1997), ki so izmerili padanje skupnih karbonilov med 30 in 60 minutami in to povezujejo s selektivnim odstranjevanjem oksidativno poškodovanih proteinov. V

nasprotju pa so Sumner in sod. (2005) pokazali, da se začne oksidacija proteinov 15 do 30 min po dodatku 0,5 mM kromovih ionov, po tem času se količina karbonilov poveča tudi za 20-krat glede na kontrolne vzorce, ki niso izpostavljeni kromu. Po 60 min so še vedno zasledili 10-kratno povečanje.

V splošnem velja, da so med najbolj oksidiranimi proteini citosolni encimi, ki so direktno vključeni v glikolizo ali v kasnejše katabolne reakcije (Shanmuganathan in sod., 2004). To se sklada s tezo, da se med oksidativnim stresom inaktivira glikolitična pot, promovira pa se pot pentoze fosfata. Takšna sprememba metabolnega fluksa pa služi kot adaptivni odgovor (Ravichandran in sod., 1994, Costa in sod., 2002, Shenton in Grant, 2003). V prehodu med eksponentno in stacionarno fazo rasti - v diauksični in postdiauksični rasti se zgodi prekop iz fermentacije v respiratorni metabolizem, kjer celice koristijo energijo iz metabolitov, ki so se proizvedli v času fermentacije. Tak prekop ima za posledico povečano tvorbo ROS (Recek, 2001).

5.1.3 Vpliv Cr(VI) ionov na lipidno peroksidacijo

Poškodbe lipidov smo določali po metodi TBA, ki temelji na kislinski razgradnji lipidnih hidroperoksidov v malondialdehide (Ortega-Villasante in sod., 2005; Nguyen-nhu in Knoop, 2002).

Primerjava vsebnosti MDA med kontrolo in izpostavljenim vzorcem nam v sredini eksponentne faze in na začetku stacionarne faze rasti ne pokaže bistvenih sprememb, ki bi bile statistično značilne. Statistično značilno povišanje MDA smo zaznali le po 1 h na začetku stacionarne faze rasti.

Cr(VI) potuje skozi membrano z difuzijo, znotraj celice pa se reducira v Cr(III), kar je povezano s toksičnostjo kroma. Med redukcijo nastajajo tudi Cr(V) kompleksi, ki reagirajo z vodikovim peroksidom, pri čemer se v Fentonovi reakciji sprostijo velike količine hidroksilnega radikala. Ker ima ta radikal izredno kratko razpolovno dobo, naredi škodo na mestu nastanka, zato domnevamo, da so primarne tarče delovanja Cr(VI) proteini in ne

lipidi, kar pa je razvidno tudi iz naših rezultatov, saj smo izmerili večje vsebnosti karbonilov kot malondialdehidov glede na kontrolo.

Rezultati so torej pokazali, da je živost celic na začetku stacionarne faze rasti višja kakor v sredini eksponentne faze, kar je posledica že vključenih obrambnih mehanizmov in manjše metabolne aktivnosti celic. Celice v stacionarni fazi so tudi bolj odporne na stres. Tudi vsebnost karbonilov se je na začetku stacionarne faze rasti v primerjavi s sredino eksponentne faze rasti zmanjšala, kar ponovno kaže na učinkovit sistem za odstranjevanje oksidativno poškodovanih proteinov. Primerjava vsebnosti MDA med kontrolo in izpostavljenim vzorcem nam v eksponentni in stacionarni fazi rasti ne pokaže bistvenih sprememb, iz česar smo sklepali, da so poškodbe lipidov manj izrazite.

5.2 SKLEPI

Na podlagi raziskovalnega dela, kjer smo preverjali trditev, da izpostavljenost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* Cr(VI) ionom v določenih koncentracijah povzroči tvorbo karbonilov in peroksidacijo lipidov, lahko podamo naslednje sklepe:

- Večja odpornost celic na Cr(VI) imajo celice v stacionarni fazi rasti, celice v eksponentni fazi rasti so bolj občutljive.
- S kovinami katalizirana oksidacija proteinov je hitra, saj zaznamo povečano vsebnost karbonilov že 15 minut po dodatku Cr(VI).
- Oksidacija lipidov je manj izrazita.

6 POVZETEK

Kvasovke in drugi aerobni organizmi so nenehno izpostavljeni toksičnim učinkom molekularskega kisika, saj reaktivne kisikove zvrsti – ROS nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom (dihanje, številne encimske reakcije). V normalnih razmerah je antioksidativni obrambni sistem dovolj učinkovit, da obdrži količino ROS na osnovnem, neškodljivem nivoju. Včasih pa se antioksidativna zmogljivost preseže in takrat nastopi oksidativni stres. Dodatek redoks aktivnih kovin, kamor spada tudi Cr(VI), še dodatno poveča količino ROS, med katerimi je najbolj uničujoč prav hidroksilni radikal, saj lahko neposredno reagira s skoraj vsemi celičnimi komponentami, povzroča pa najbolj izrazite oksidativne poškodbe. Najpogostejše tarče delovanja hidroksilnega radikala so tako proteini, lipidi in DNA.

Celice kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo v sredini sredini eksponentne faze in v začetku stacionarne faze rasti izpostavili 1 mM koncentraciji Cr(VI) in preverili njegov vpliv na živost in nastajanje oksidativnih poškodb proteinov in lipidov, in sicer 15 minut, 1 uro in 2 uri po dodatku Cr(VI).

Živost celic se je po dodatku Cr(VI) zmanjšala, vendar so celice bolj odporne v stacionarni fazi rasti v primerjavi z eksponentno fazo, kjer smo v 2-h izpostavitvi izmerili 30 – 40 % padec živosti glede na kontrolo. V stacionarni fazi rasti je bil padec le 15 – 25 % glede na kontrolo. Po dodatku Cr(VI) tako v eksponentni kot v stacionarni fazi rasti smo po 15 min izmerili porast karbonilov glede na kontrolo. Po 1 in 2 h od dodatka je bila vsebnost nižja v primerjavi s kontrolo, kar nakazuje na indukcijo sekundarnih antioksidativnih obrambnih sistemov, v tem primeru sistema za odstranjevanje oksidativno poškodovanih proteinov, za katerega pa je že znano, da je bolj učinkovit v stacionarni fazi rasti. Učinkovitejše odstranjevanje oksidativno poškodovanih proteinov v primerjavi z eksponentno fazo rasti se kaže tudi v večji odpornosti celic v stacionarni fazi rasti. Primerjava vsebnosti MDA med kontrolo in izpostavljenim vzorcem nam v eksponentni in stacionarni fazi rasti ne pokaže bistvenih sprememb, iz tega pa smo sklepali, da so poškodbe lipidov manj izrazite kot poškodbe proteinov.

Z raziskovalno nalogo smo potrdili hipotezo, kjer smo predvideli, da izpostavljenost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* Cr(VI) ionom vodi k nastanku karbonilov, medtem ko peroksidacije lipidov nismo zaznali.

7 VIRI

- Ackerley D.F., Gonzalez C.F., Keyhan M., Blake R., Martin A. 2004. Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology*, 6, 8: 851-860.
- Adams S., Green P., Claxton DR., Simcox S., Williams M.V., Walsh K., Leeuwenburgh C. 2001. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Frontiers in Bioscience*, 6: 17-24.
- Alcedo J., Wetterhahn K.E. 1990. Chromium toxicity and carcinogenesis. *International Review of Experimental Pathology*, 31: 85-107.
- Arslan P., Beltrame M., Tomasi A. 1987. Intracellular chromium reduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 931: 10-15.
- Atlas R.M. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 1006-1007.
- Beckman K.B., Ames B.N. 1997. Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 19633-19636.
- Benaroudj N., Lee D.R., Goldberg A.L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cell and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 24261-24267.
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 2, suppl 1: 3-8.
- Borges F., Fernandes E., Roleira F. 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medical Chemistry*, 9: 195-217.

- Borst-Pauwels G.W.F.H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 650: 88-127.
- Cabiscol E., Piulats E., Echave P., Herrero E., Roos J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 27393-27398.
- Cadenas E., Sies H. 1998. The lag phase. *Free Radical Research*, 28: 601-609.
- Cadenas E., Davies K.J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 222-230.
- Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C., Moreno-Sanchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 335-347.
- Cieslak-Golonka M. 1996. Toxic and mutagenic effect of chromium(VI). A review. *Polyhedron*, 15: 3667-3689.
- Cohen J.J. 1993. Overview: mechanisms of apoptosis. *Immunology Today*, 14, 3: 126-130.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, 17: 1195-1214.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into aging, apoptosis and diseases. Review. *Molecular Aspect of Medicine*, 22: 217-246.

- Costa W.M.V., Amorim M.A., Quintanilha A., Moradas-Ferreira P. 2002. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radical Biology & Medicine*, 33: 1507-1515.
- Dalle-Donne I., Scaloni A., Giustarini D., Cavarra E., Tell G., Lungarella G. 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24: 55-99.
- Davies K.J.A. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83: 301-310.
- Dayan A.D., Paine A.J. 2001. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Human & Experimental Toxicology*, 20: 439-451.
- Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324: 1-18.
- Desideri A., Falconi M. 2003. Prokaryotic Cu,Zn superoxides dismutases. *Biochemical Society Transactions*, 31: 1322-1325.
- De Flora S., Wetterhahn K.E. 1989. Mechanism of chromium metabolism and genotoxicity. *Life and Chemistry Reports*, 7,3: 169-244.
- De Grey A.D.N.J. 2002. HO₂•: The forgotten radical. *DNA and Cell Biology*, 21: 251-257.
- DeCoursey T.E., Ligeti E. 2005. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 2173-2193.

- Do T.Q., Shultz J.R., Clarke C.F. 1996. Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to product of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 7534-7539.
- Gellon L., Barbey R., Kemp P.A., Thomas D., Boiteux S. 2001. Synergism between base excision repair, mediated by DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 1087-1096.
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M.B., Labaree J. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34: 22480- 22489.
- Grune T., Reinheckel T., Joshi M., Davies K.J.A. 1995. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 5: 2344-2351.
- Grune T., Reinheckel T., Davies K.J. 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal*, 6: 526-534.
- Gupta M., Dobashi K., Greene E.L., Orak J.K., Singh I. 1997. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 176: 337-347.
- Halliwell B., Auroma O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. V: Antioxidants in nutrition, health and disease. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (eds). Oxford, Oxford University Press: 111-135.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.

Haugland R.P. 2002. Nucleic acid detection and genomics technology. V: Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 9th ed. Gregory J. (ed.). Eugene, Molecular Probes: 265-352.

Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Current Medicinal Chemistry, 10: 2495-2505.

Jamieson D.J., Rivers S.L., Stephen D.W.S. 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. Microbiology, 140: 3277-3283.

Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 14: 1511-1527.

Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of Yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17, 6: 316-323.

Kasprzak K.S. 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. Cancer Investigation, 13: 411-430.

Kilic E., Saraymen R., Demiroglu A., Ok E. 2004. Chromium and manganese levels in the scalp hair of normals and patients with breast cancer. Biological Trace Element Research, 102: 19-25.

Klaunig J.E., Xu Y., Bachowski S., Jiang J. 1997. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. V: Free radical toxicology . Wallace K.B. (ed.). London, Taylor & Francis: 375-400.

Klein C.B., Snow E.T., Frenkel K. 1998. Molecular mechanisms in metal carcinogenesis: role of oxidative stress. V: Molecular biology of free radicals in human diseases. Aruoma O.I., Halliwell B. (eds.). Santa Lucia, London, OICA International: 79- 137.

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

Kovacic P., Pozos R.S., Somanathan R., Shangari N., O'Brien P.J. 2005. Mechanisms of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 2601-2623.

Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. 1999. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 16040-16046.

Lee J., Kwon, Kim D.W., Cha J., Roe J.H. 2002. Regulation and the role of Cu,Zn-containing superoxide dismutase in cell cycle progression of *Shizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297: 854-862.

Lee S.M., Park J.W. 1998. A yeast mutant lacking thiol-dependent protector protein is hypersensitive to menadione. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1382: 167-175.

Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233: 346-357.

Levine R.L., Mosoni L., Berlett B.S., Stadtman E.R. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 15036-15040.

- Levine R.L., Stadtman E.R. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36: 1495-1502.
- Levis A.G., Bianchi V. 1982. Mutagenic and cytogenetic effects of chromium compounds. V: Langard S. (ed.). *Biological and Environmental Aspects of Chromium*. Amsterdam, Elsevier: 171-208.
- Liochev S.I., Fridovich I. 1994. The role of O₂⁻ in the production of OH⁻ *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 16: 29-33.
- Loschen G., Flohe B. 1971. Chance respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Letters*, 18: 261-263.
- Mager W.H., Hohmann S. 1997. Stress response mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 1-5.
- Marnett L.J. 1999. Lipid peroxidation- DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424: 83-95.
- Marnett L.J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21: 361-370.
- Mattagasingh S.N., Misra H.P. 1999. Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-protein crosslinks induced by a carcinogenic chromium(VI) in cultured intact human cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 199, 1-2: 149-162.
- McGrath S.P., Smith S. 1990. Chromium and nickel. V: *Heavy metals in soils*. Alloway B.J. (ed.). New York, Wiley: 125-150.

Meeusen S., Tieu Q., Wong E., Weiss E., Schieltz D., Yates J.R., Nunnari J. 1999. Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *Journal of Cell Biology*, 145: 291-304.

Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 17: 235-248.

Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. 1990. Transition metals as catalysts of »autoxidation« reaction. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 8: 95-108.

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

Moskovitz J., Berlett B.S., Poston J.M., Stadtman E.R. 1997. The yeast peptide methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 9585-9589.

Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 49064-49073.

Nguyen-Nhu N.T., Knoops B. 2002. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protect *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicology Letters*, 135: 219-228.

Nyska A., Kohen R. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30: 620-650.

- Ortega-Villasante C., Rellán-Álvarez R., Del Campo F.F., Carpena-Ruiz R.O., Hernández R.E. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 56, 418: 2239-2251.
- O'Brien T., Xu J., Patierno S.R. 2001. Effects of glutathione on chromium-induced DNA crosslinking and DNA polymerase arrest. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222: 173-182.
- Pastor N., Weinstein H., Jamison E., Brenowitz M. 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanisms of sequencespecific binding. *Journal of Molecular Biology*, 304: 55-68.
- Pinchuk I., Schnitzer E., Lichtenberg D. 1998. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochimica et Biophysica Acta- Lipids and Lipid Metabolism.*, 1389: 155-172.
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284: 805-808.
- Ravichandran V., Seres T., Moriguchi T., Thomas J.A., Johnston R.D. 1994. S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 25010-25015.
- Recek M. 2001. Vpliv faktorjev okolja na fiziologijo rasti in sprejemanje kromovih ionov pri kvasovki *Candida intermedia*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 120 str.
- Ruis H. 1997. Yeast stress responses: achievements, goals and look beyond yeast. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 231-247.

- Santoro N., Thiele D.J. 1997. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 171-211.
- Shanmuganathan A., Avery S.V., Willetts S.A., Houghton J.E. 2004. Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. FEBS Letters, 556: 253-259.
- Shi X.L., Dalal N.S. 1990. NADPH-dependent flavoenzymes catalyze one electron reduction of metal ions and molecular oxygen and generate hydroxyl radicals. FEBS Letters, 276: 189-191.
- Shi X., Dong Z., Dalal N.S., Gannet P.M. 1994. Chromate-mediated free radical generation from cystein, penicillamine, hydrogen peroxide, and lipid hydroperoxides. Biochimica et Biophysica Acta, 1226: 65-72.
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms – I. Microbial vs. Higher cells – damage and defenses in relation to cell aging and death. Folia Microbiologica, 44, 6: 587-624.
- Singer M.A., Lindquist S. 1998. Multiple effect of trehalose on protein folding *in vivo* and *in vitro*. Molecular Cell, 1: 639-648.
- Stadtman E.R. 1992. Protein oxidation in aging. Science, 257, 5074: 1220-1224.
- Stadtman E.R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annual Review of Biochemistry, 62: 797-821.
- Stadtman E.R. 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. Annals of the New York Academy of Sciences, 928: 22-38.

- Stohs S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18: 321-336.
- Sumner E.R., Avery A.M., Houghton J.E., Robins R.A., Avery S.V. 2003. Cell cycle-and age-dependent activation of Sod1p drives the formation of stress-resistant cell subpopulations within clonal yeast cultures. *Molecular Microbiology*, 50: 857-870.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266: 37-56.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1161-1208.
- Vorbach C., Harrison R., Capecchi M.R. 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*, 24: 512-517.
- Walker J.M. 1998. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. V: The protein protocols handbook. Walker J.M. (ed.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 55-61.
- Welch K.D., van Eden M.E., Aust S.D. 2001. Modification of ferritin during iron loading. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 999-1006.
- Wiegand H.J., Ottenwalder H., Bolt H.M. 1984. The reduction of chromium (VI) to chromium (III) by glutathione: an intracellular redox pathway in the metabolism of the carcinogen chromate. *Toxicology*, 33, 3-4: 341-348.

You H.J., Swanson R.L., Harrington C., Corbett A.H., Jinks-Robertson S., Sentuerker S., Wallace S.S., Boiteux S., Dizdaroglu M., Doetsch P.W. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: broad specificity N-glycosylases for the repair of oxidative DNA damage in the nucleus and mitochondria. *Biochemical Journal*, 38: 11298-11306.

Zhitkovich A., Voitkun V., Costa M. 1996. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium *in vitro*: importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry*, 35, 22: 7275-7282.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Rasporju za pregled in koristne nasvete pri opravljanju diplomskega dela.

Še posebej bi se rada zahvalila somentorici in delovni mentorici doc. dr. Poloni Jamnik za potrpežljivost, vzpodbudo in poglobljene razprave ter za vse prijazne besede in pogovore tudi o najbolj vsakdanjih stvareh.

Prof. dr. Tomu Turku se zahvaljujem za hiter in temeljit pregled diplomske naloge.

Zahvalila bi se tudi doc. dr. Lei Gašperlin za opravljeno statistično analizo podatkov.

Zahvala gre tudi ga. Ivici Hočevar za pregled in urejanje virov ter ga. Dragici Marković za pomoč pri urejanju birokratskih zadev.

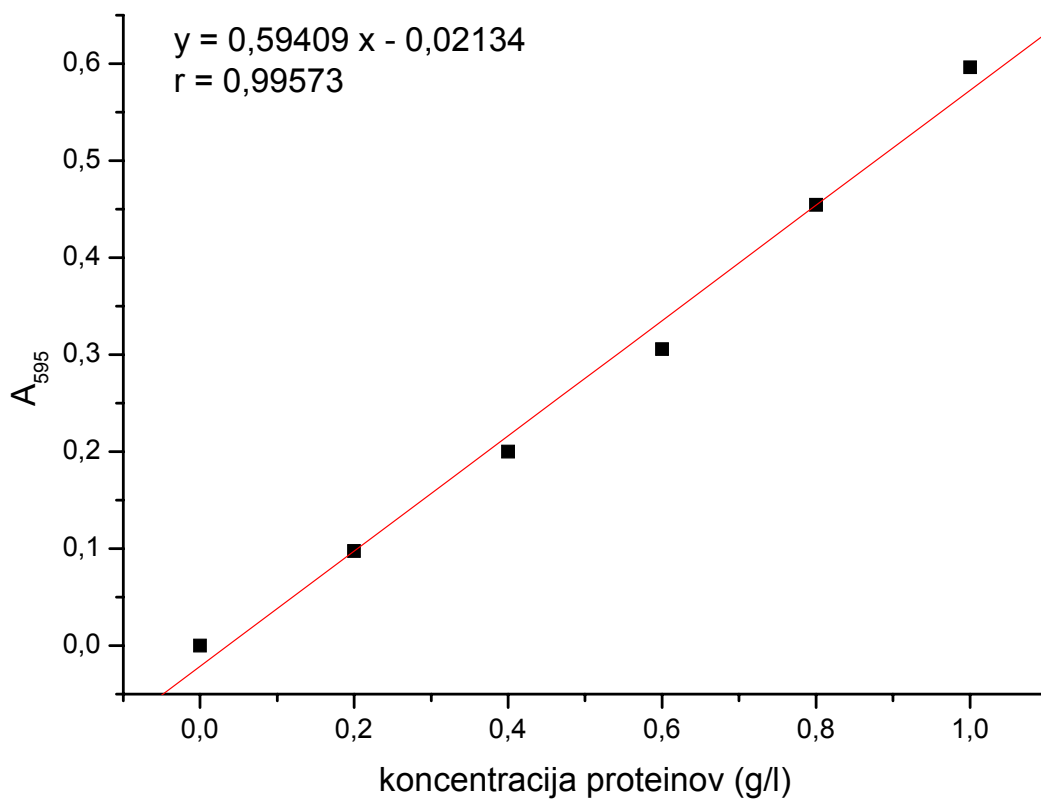
Za pomoč in dobro delovno vzdušje v laboratoriju in izven njega se zahvaljujem Vasilki, Blažu, Dušanu, Marku in Roku.

Hvala tudi Arijani, Bojani, Janji, Mili, Nini, Romani, Valeriji in ostalim za potrpežljivo poslušanje in vzpodbudne besede predvsem v časih, ko je šlo vse narobe.

Največjo zahvalo pa dolgujem svoji družini, ker mi stojijo ob strani in me vzpodbujajo že celo življenje. Hvala vama ati in mami, da sta mi omogočila študij in najlepša študentska leta.

HVALA VSEM!

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje mase skupnih proteinov v biomasi kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*- ZIM 2155.

Priloga B1: Izračunane vrednosti s povprečno vrednostjo in standardno deviacijo za živost v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

čas	živost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (%)	standardna deviacija
15 min	52,9	/
	59,7	/
	58,9	/
<i>povprečje</i>	57,2	3,72
1 h	47,5	/
	65,7	/
	76,0	/
<i>povprečje</i>	63,1	14,43
2 h	78,3	/
	70,3	/
	74,3	/
<i>povprečje</i>	74,3	4,0

Priloga B2: Izračunane vrednosti s povprečno vrednostjo in standardno deviacijo za živost na začetku stacionarne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

čas	živost kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (%)	standardna deviacija
15 min	102,6	/
	68,5	/
	96,4	/
	73,6	/
<i>povprečje</i>	85,3	16,75
1 h	67,5	/
	83,2	/
	73,2	/
	<i>povprečje</i>	74,6
2 h	84,9	/
	88,7	/
	83,6	/
	78,8	/
<i>povprečje</i>	84,0	4,09

Priloga B3: Izračunane vrednosti za vsebnost karbonilov ter povprečna vrednost in standardna deviacija v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

čas -KONTROLA	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
15 min	0,11	/
	0,09	/
	0,08	/
<i>povprečje</i>	0,09	0,016

čas- VZOREC	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
15 min	0,15	/
	0,12	/
	0,08	/
	0,11	/
<i>povprečje</i>	0,12	0,029

čas-KONTROLA	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
1 h	0,08	/
	0,09	/
<i>povprečje</i>	0,09	0,01

čas-VZOREC	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
1 h	0,07	/
	0,03	/
	0,05	/
	0,06	/
<i>povprečje</i>	0,05	0,017

čas-KONTROLA	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
2 h	0,08	/
	0,08	/
<i>povprečje</i>	0,08	0

čas-VZOREC	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna
-------------------	---	-------------------

	deviacija	
2 h	0,06	/
	0,05	/
	0,07	/
<i>povprečje</i>	0,06	0,01

Priloga B4: Izračunane vrednosti za vsebnost karbonilov ter povprečna vrednost in standardna deviacija na začetku stacionarne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

čas -KONTROLA	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
15 min	0,04	/
	0,05	/
<i>povprečje</i>	0,05	0,01

čas- VZOREC	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
15 min	0,09	/
	0,08	/
<i>povprečje</i>	0,09	0,01

čas-KONTROLA	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
1 h	0,06	/
	0,05	/
<i>povprečje</i>	0,06	0,01

čas-VZOREC	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
1 h	0,02	/
	0,02	/
<i>povprečje</i>	0,02	0

čas-KONTROLA	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
2 h	0,06	/
	0,05	/

<i>povprečje</i>	0,06	0,01
čas-VZOREC	vsebnost karbonilov (g⁻¹)	standardna deviacija
2 h	0	/
	0	/
<i>povprečje</i>	0	0

Priloga B5: Izračunane vrednosti za vsebnost malondialdehidov (MDA) ter povprečna vrednost in standardna deviacija v sredini eksponentne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

čas -KONTROLA	vsebnost MDA (μg⁻¹)	standardna deviacija
15 min	0,93	/
	0,86	/
<i>povprečje</i>	0,90	0,05

čas- VZOREC	vsebnost MDA (μg⁻¹)	standardna deviacija
15 min	1,09	/
	0,97	/
<i>povprečje</i>	1,03	0,085

čas-KONTROLA	vsebnost MDA (μg⁻¹)	standardna deviacija
1 h	0,58	/
	1,04	/
<i>povprečje</i>	0,81	0,33

čas-VZOREC	vsebnost MDA (μg⁻¹)	standardna deviacija
1 h	0,74	/
	0,83	/

<i>povprečje</i>	0,79	0,064
čas-KONTROLA	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
2 h	0,78	/
	0,82	/
<i>povprečje</i>	0,80	0,028
čas-VZOREC	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
2 h	0,59	/
	0,71	/
<i>povprečje</i>	0,65	0,085

Priloga B6: Izračunane vrednosti za vsebnost malondialdehidov (MDA) ter povprečna vrednost in standardna deviacija na začetku stacionarne faze rasti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

čas -KONTROLA	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
15 min	0,21	/
	1,23	/
<i>povprečje</i>	0,72	0,72
čas- VZOREC	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
15 min	0,76	/
	1,09	/
<i>povprečje</i>	0,93	0,23
čas-KONTROLA	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
1 h	0,77	/
	0,79	/

<i>povprečje</i>	0,78	0,014
čas-VZOREC	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
1 h	1,04	/
	1,02	/
<i>povprečje</i>	1,03	0,014
čas-KONTROLA	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
2 h	0,69	/
	0,87	/
<i>povprečje</i>	0,78	0,127
čas-VZOREC	vsebnost MDA (μg^{-1})	standardna deviacija
2 h	0,41	/
	0,98	/
<i>povprečje</i>	0,70	0,403