

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ana VELIKONJA

**PROTEINSKI IN FENOLNI PROFIL IZVLEČKOV
LISTOV SVEŽE IN IZSUŠENE RASTLINE *Ramonda
nathaliae* IN NJIHOVO ANTIOKSIDATIVNO
DELOVANJE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ana VELIKONJA

**PROTEINSKI IN FENOLNI PROFIL IZVLEČKOV LISTOV SVEŽE
IN IZSUŠENE RASTLINE *Ramonda nathaliae* IN NJIHOVO
ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PROTEIN AND PHENOLIC PROFILES AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF EXTRACTS OF LEAVES FROM WATERED AND
DESICCATED *Ramonda nathaliae* PLANTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Polono Jamnik, za somentorico dr. Marjetko Kidrič in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Somentorica: dr. Marjetka Kidrič

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Članica: doc. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica: dr. Marjetka Kidrič
Institut »Jožef Stefan«, Odsek za biotehnologijo
Član: doc. dr. Blaž Cigić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 26. 9. 2011

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Velikonja

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.112:581.17:582.916.61(043)=163.6
KG proteomika/proteinski profil/fenolni profil/odziv na sušni stres/na izsušitev tolerantne rastline/*Ramonda nathaliae* Panč. et. Petrov./rastlinski izvlečki/antioksidativna učinkovitost/*in vitro* metode/*in vivo* metode/*Saccharomyces cerevisiae*/znotrajcelična oksidacija/celična metabolna aktivnost/lipidna peroksidacija
AV VELIKONJA, Ana
SA JAMNIK, Polona (mentorica)/KIDRIČ, Marjetka (somentorica)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN PROTEINSKI IN FENOLNI PROFIL IZVLEČKOV LISTOV SVEŽE IN IZSUŠENE RASTLINE *Ramonda nathaliae* IN NJIHOVO ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 76 str., 24 pregl., 15 sl., 2 pril., 130 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI *Ramonda nathaliae* spada v majhno skupino višjih rastlin sposobnih oživitve potem, ko preživijo daljša obdobja brez vode. Raziskovali smo vsebnost nekaterih bioaktivnih učinkovin v listnih izvlečkih ter opazovali njihov antioksidativni vpliv na kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Poudarek je bil na razlikah med izsušenimi rastlinami (relativna vsebnost vode /RVV/ v listih ~ 5 %), rehidriranimi rastlinami 48 ur po začetku ponovnega zalivanja (RVV ~ 95 %) in kontrolnimi, redno zalivanimi rastlinami (RVV ~ 99 %). Proteinske profile smo analizirali z 2-D elektroforezo. Kvantitativno ovrednotenje gelov je pokazalo povečano izražanje kot tudi *de novo* sintezo večjega števila proteinov v listih izsušenih rastlin v primerjavi s kontrolami. Med rehidracijo se je ponovno vzpostavil proteinski profil primerljiv profilu listov kontrolnih rastlin. Polifenolna profila v izvlečkih listov redno zalivanih rastlin in izsušenih rastlin, ki smo ju določili s kromatografsko analizo, sta se le malo razlikovala. V listih rastline *R. nathaliae* smo določili masni delež polifenolov v suhi snovi, izražen kot delež galne kisline. Največjo vsebnost polifenolnih antioksidantov (12%) smo določili po ekstrakciji s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino (izvleček 1), najmanjšo pa po ekstrakciji s fosfatnim pufrom (izvleček 3), medtem ko smo v ekstraktu pripravljenem s 96 % etanolom (izvleček 2) ugotovili največje odstopanje v vsebnosti fenolov med listi kontrolnih in izsušenih rastlin. Izvlečka 2 in 3 sta povečala oksidacijo v celicah kvasovke, medtem ko jo je izvleček 1 nekoliko znižal. Razlike med listi smo ugotovili le pri izvlečku 3, kjer je bila oksidacija bolj povečana pri izvlečku iz listov izsušenih rastlin. Izvlečka 1 in 3 sta povečala celično energijsko metabolno aktivnost (CEMA), izvleček 2 pa jo je znižal. Razlika med listi v vplivu na CEMA je bila opazna le pri izvlečku 3, kjer je izvleček iz listov izsušenih rastlin bolj povečal CEMA. Izvleček 1 pri testirani koncentraciji ni zaščitil celičnih membran pred lipidno peroksidacijo, ki jo je povzročil menadion.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.112:581.17:582.916.61(043)= 163.6
CX proteomics/protein profile/phenolic profile/drought stress response/desiccation tolerant plant/*Ramonda nathaliae* Panč. et. Petrov./plant extracts/antioxidant activity/*in vitro* methods/*in vivo* methods/*Saccharomyces cerevisiae*/intracellular oxidation/cell metabolic activity/lipid peroxidation
AU VELIKONJA, Ana
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/KIDRIČ, Marjetka (co-advisor)/CIGIČ, Blaž (reviewer)
PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI PROTEIN AND PHENOLIC PROFILES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS OF LEAVES FROM WATERED AND DESICCATED *Ramonda nathaliae* PLANTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 76 p., 24 tab., 15 fig., 2 ann., 130 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Ramonda nathaliae* belongs to a small group of higher plants (resurrection plants) able to revive after surviving nearly complete water withdrawal. We have investigated the bioactive compounds in extracts of leaves from *R. nathaliae* and observed their antioxidative effects on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The emphasis was on differences between desiccated plants (relative water content (RWC) in the leaves ~ 5 %), rehydrated plants after 48h of re-watering (RWC ~ 95 %), and control, fully-hydrated plants (RWC ~ 99 %). Protein profiles were analysed using 2-D electrophoresis. Quantitative evaluation of gels showed increased expression as well as *de novo* synthesis of a large number of proteins in leaves of desiccated plants compared to controls. During rehydration the protein profile was restored to one comparable to that of control leaves. Phenolic profiles determined by chromatographic analysis differed slightly from those of extracts of leaves from desiccated and fully hydrated plants. Mass proportion of polyphenols was determined and expressed as the percentage of gallic acid in dry matter of leaves from *R. nathaliae*. The highest content of phenolic antioxidants (12 %) was observed in extracts made with 50 % ethanol/2 % acetic acid (Extract 1) and the lowest in phosphate buffer extracts (Extract 3). Extracts prepared with 96 % ethanol (Extract 2) showed the largest difference in phenolic content between leaves from hydrated and desiccated plants. Extracts 2 and 3 increased oxidation in living yeast cells, while Extract 1 decreased it slightly. In the case of treatment with Extract 3, there was a significant difference in the increase of intracellular oxidation between extracts of leaves from hydrated and desiccated plants. Extracts 1 and 3 increased cell energy metabolic activity (CEMA) whereas Extract 2 lowered it. The difference in impact on CEMA between hydrated and desiccated leaves was observed only with Extract 3, where the desiccated leaves caused greater CEMA. Extract 1 did not protect cell membranes against lipid peroxidation caused by menadione.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1. 1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1. 2 CILJI NALOGE.....	2
1. 3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2. 1 RASTLINE KOT VIR BIOAKTIVNIH UČINKOVIN.....	3
2. 1. 1 Vpliv stresnih dejavnikov na proizvodnjo sekundarnih metabolitov rastlin	4
2.2 ODZIV RASTLIN NA SUŠNI STRES	5
2.2.1 Rastline sposobne oživitve (rastline tolerantne na izsušitev)	6
2.2.1.1 Prilagoditveni mehanizmi rastlin sposobnih oživitve na sušo/izsušitev	7
2.2.2 Študije proteinov pri rastlinah tolerantnih na izsušitev	7
2.2.3 Antioksidativni sistem rastlin sposobnih oživitve	9
2.3 RASTLINE RODU <i>Ramonda</i>	9
2.3.1 Antioksidativni mehanizmi rodu <i>Ramonda</i>	11
2.4 METODE ZA UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA BIOAKTIVNIH UČINKOVIN	12
2.4. 1 Metode <i>in vitro</i>	12
2.4.1.1 Metode, ki temeljijo na reakciji antioksidantov s stabilnimi prostimi radikali.....	12
2.4.1.2 Metoda za določanje skupnih fenolov z Folin – Ciocalteuovim reagentom.....	13
2.4.1.3 Fluorescenčne metode za določevanje antioksidativne učinkovitosti.....	13
2.4.1.4 Metode, ki temeljijo na redukciji kovinskih ionov: FRAP, CUPRAC	13
2.4.1.5 Antioksidanti in lipidna peroksidacija.....	14
2.4.2 Metode <i>in vivo</i>	14
2.4.2.1 Kvasovka <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kot modelni organizem za <i>in vivo</i> določanje antioksidativnih učinkovin.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 POTEK DELA.....	16
3.2 MATERIALI	17
3. 2. 1 Rastlinski material	17
3. 2. 2 Mikroorganizem	17
3. 2. 3 Gojišča	18

3. 2. 4 Raztopine in reagenti	18
3.2.4.1 Priprava ekstraktov iz listov <i>Ramonda nathaliae</i> za proteomsko analizo ..	18
3.2.4.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnih ekstraktih listov	19
3.2.4.3 Čiščenje proteinskih ekstraktov	19
3.2.4.4 Proteomska analiza z 2-D elektroforezo	19
3.2.4.5 Detekcija proteinov na gelu.....	21
3.2.4.6 Priprava izvlečkov liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline <i>Ramonda nathaliae</i> za analizo fenolnega profila z LC-UV	21
3.2.4.7 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	21
3.2.4.8 Analiza fenolnih spojin z LC-UV	21
3.2.4.9 Priprava rastlinskih izvlečkov iz liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	22
3.2.4.10 <i>In vitro</i> določanje vsebnosti fenolnih spojin v izvlečkih, pripravljenih z različnimi topili - metoda po Folinu.....	22
3.2.4.11 <i>In vivo</i> določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov, pripravljenih z različnimi topili	22
3. 2. 5 Aparature in pribor	24
3.2.5.1 Gojenje in vzorčenje rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	24
3.2.5.2 Priprava ekstraktov iz listov <i>Ramonda nathaliae</i> za proteomsko analizo ..	24
3.2.5.3 Določanje koncentracije proteinov in čiščenje proteinskih ekstraktov	24
3.2.5.4 2-D elektroforeza.....	25
3.2.5.5 Detekcija gelov in analiza slike.....	25
3.2.5.6 Priprava izvlečkov liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline za analizo fenolnega profila	26
3.2.5.7 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	26
3.2.5.8 Analiza fenolnih spojin z LC-UV	26
3.2.5.9 Priprava izvlečkov in določanje njihovega antioksidativnega delovanja....	26
3.2.5.10 <i>In vitro</i> določanje fenolnih spojin v izvlečkih, pripravljenih z različnimi topili - metoda po Folinu.....	26
3.2.5.11 <i>In vivo</i> določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov, pripravljenih z različnimi topili	27
3.2.5.12 Potrošna oprema in aparatura za shranjevanje vzorcev	27
3.3 METODE	28
3. 3. 1 Gojenje in vzorčenje rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	28
3.3.1.1 Določanje vsebnosti vode (VV) in relativne vsebnost vode (RVV) v listih	28
3. 3. 2 Proteomska analiza ekstraktov listov kontrolnih/dehidriranih/rehidriranih rastlin <i>Ramonda nathaliae</i>.....	29
3. 3. 2. 1 Priprava celičnih ekstraktov iz listov – ekstrakcija proteinov.....	29
3. 3. 2. 2 Določanje koncentracije proteinov v ekstraktih.....	30
3. 3. 2. 3 Čiščenje proteinskih ekstraktov	30
3. 3. 2. 4 2-D elektroforeza.....	31
3. 3. 2. 5 Detekcija proteinov na gelu.....	32
3. 3. 2. 6 Slikanje gelov in računalniška obdelava slik	33
3. 3. 3 Analiza fenolov v izvlečkih liofiliziranih listov hidrirane in dehidrirane rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	33
3.3.3.1 Priprava izvlečkov liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline <i>R. nathaliae</i> za LC-UV analizo	33

3.3.3.2 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	34
3.3.3.3 Analiza fenolnih spojin z LC-UV	34
3. 3. 4 Antioksidativno delovanje različno pripravljenih listnih izvlečkov rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	35
3. 3. 4. 1. Priprava rastlinskih izvlečkov iz liofiliziranih listov hidrirane in dehidrirane (izsušene) rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	35
3. 3. 4. 2 <i>In vitro</i> določanje celokupne vsebnosti fenolnih spojin v izvlečkih, pripravljenih z različnimi topili - metoda po Folinu	35
3. 3. 4. 3 <i>In vivo</i> določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov <i>Ramonda nathaliae</i> , pripravljenih z različnimi topili.....	35
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	39
4. 1 GOJENJE IN VZORČENJE RASTLINE <i>Ramonda nathaliae</i>	40
4. 2 PROTEOMSKA ANALIZA EKSTRAKTOV LISTOV KONTROLNE/ DEHIDRIRANE/REHIDRIRANE RASTLINE <i>Ramonda nathaliae</i> z 2–D ELEKTROFOREZO	43
4. 3 ANALIZA FENOLOV V IZVLEČKIH LIOFILIZIRANIH LISTOV HIDRIRANE IN DEHIDRIRANE RASTLINE <i>Ramonda nathaliae</i>	47
4. 4 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE RAZLIČNO PRIPRAVLJENIH LISTNIH IZVLEČKOV RASTLINE <i>Ramonda nathaliae</i>	53
4.4.1 <i>In vitro</i> določanje vsebnosti fenolnih spojin v izvlečkih pripravljenih z različnimi topili – metoda po Folinu.....	54
4.4.2 <i>In vivo</i> določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov <i>Ramonda nathaliae</i> , pripravljenih z različnimi topili.....	56
4.4.2.1 Določanje znotrajcelične oksidacije.....	56
4.4.2.2 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti	60
4.4.2.3 Določanje lipidne peroksidacije	61
5 SKLEPI	62
6 POVZETEK.....	64
7 VIRI	66

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1996).....	18
Preglednica 2: Sestava tekočega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1996).....	18
Preglednica 3: Sestava pufru za ekstrakcijo proteinov.....	19
Preglednica 4: Sestava raztopine za rehidracijo trakov.....	19
Preglednica 5: Sestavine za pripravo ločilnega gela debeline 1 mm.....	20
Preglednica 6: Sestavine za 1-kratni SDS pufer.....	20
Preglednica 7: Sestavine za pufer za uravnoteženje –osnovni.....	20
Preglednica 8: Sestavine za pripravo agarozne raztopine.....	21
Preglednica 9: Sestava PBS pufru.....	22
Preglednica 10: Sestava 50 mM K ₂ HPO ₄	22
Preglednica 11: Sestava 50 mM KHPO ₄	23
Preglednica 12: Sestava 1 mM raztopine H ₂ DCFDA.....	23
Preglednica 13: Sestava 50 mM Na ₂ HPO ₄	23
Preglednica 14: Sestava 50 mM KH ₂ PO ₄	23
Preglednica 15: Sestavine reagenta za določanje lipidne peroksidacije.....	24
Preglednica 16: Gradient mobilne faze A in B za kromatografsko separacijo.....	34
Preglednica 17: Vsebnosti vode (VV) in relativne vsebnosti vode (RVV) v hidriranih, izsušenih in rehidriranih listih <i>Ramonda nathaliae</i>	42
Preglednica 18: Koncentracija proteinov v neočiščenih ekstraktih kontrolnih listov, izsušenih listov.....	43
Preglednica 19: Prikaz sprememb v izražanju proteinov pri vzorcih listov <i>R. nathaliae</i> v fazi izsušitve in rehidracije glede na izražanje proteinov v vzorcih kontrolnih (hidriranih) listov.....	45
Preglednica 20: Površine kromatografskih vrhov spojin in relativna primerjava kromatografskih površin izvlečkov hidriranih ter dehidriranih listov <i>R. nathaliae</i>	49
Preglednica 21: Površine kromatografskih vrhov spojin in relativna primerjava kromatografskih površin izvlečkov hidriranih ter dehidriranih listov <i>R. nathaliae</i> po kisli hidrolizi.....	51
Preglednica 22: Površine kromatografskih vrhov spojin in relativna primerjava kromatografskih površin netopnih preostankov hidriranih ter dehidriranih listov <i>R. nathaliae</i> izpostavljenih kisli hidrolizi.....	53
Preglednica 23: Preliminarna določitev koncentracije fenolnih spojin liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	54
Preglednica 24: Vsebnost fenolnih spojin izražena kot masni ekvivalent galne kisline liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in suhe rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti (Al-Gubory in sod., 2010: 1636).....	4
Slika 2: Strkturne formule fenola, galne kisline in klorogenske kisline (NCBI, 2011)	5
Slika 3: Shematski prikaz poteka dela.....	16
Slika 4: Izpostavljanje rastline <i>Ramonda nathaliae</i> izsušitvi in rehidraciji.	40
Slika 5: Del postopka določanja RVV listov izsušenih rastlin.....	41
Slika 6: Reprezentativni proteinski profili ekstraktov hidriranih/izsušenih/rehidriranih listov <i>R. nathaliae</i>	44
Slika 7: Kromatografska analiza fenolnih spojin v izvlečkih listov rastlin <i>R. nathaliae</i> ...	48
Slika 8: Kromatografska analiza fenolnih spojin v izvlečkih listov hidriranih in dehidriranih rastlin <i>R. nathaliae</i> po kisli hidrolizi. Kromatogrami so izrisani pri valovni dolžini 300 nm.....	50
Slika 9: Kromatografska analiza fenolnih spojin netopnih preostankov po ekstrakciji listov hidriranih in dehidriranih rastlin <i>R. nathaliae</i> izpostavljenih kisli hidrolizi.	52
Slika 10: Vsebnost fenolnih spojin liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline <i>Ramonda nathaliae</i>	55
Slika 11: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po tretiranju s topilom ter rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov pripravljenih s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino.	57
Slika 12: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po tretiranju s topilom ter rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih listov), pripravljenih s 96 % etanolom.	58
Slika 13: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po tretiranju s topilom ter rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov, pripravljenih s PBS pufrom (vodni izvleček).....	59
Slika 14: Znotrajcelična energijska metabolna aktivnost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po tretiranju s tremi topili in tremi vrstami rastlinskih izvlečkov iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov pripravljenih v topilih različnih polarnosti.....	60
Slika 15: Lipidna peroksidacija celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po tretiranju z rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov pripravljenih s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino ter tretiranju z menadionom.....	61

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu po Bradfordovi
- Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje celokupne vsebnosti fenolnih spojin glede na koncentracijo galne kisline v izvlečku

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-DE	dvodimenzionalna gelska elektroforeza
ABA	abscizinska kislina
ABTS	metoda za določanje antioksidativnega delovanja z uporabo stabilnega radikala (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina))
ALDH	družina encimov aldehydnih-dehidrogenaz
APS	amonijev persulfat
BFM	bromfenol modro
BHT	butiliran hidroksitoulén (ang. butylated hydroxytoluene)
BSA	goveji serumski albumin
cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CEMA	celična energijska metabolna aktivnost
CHAPS	3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonijev]-1-propan-sulfonat (ang. 3-3-[(3-chloroamidopropyl)dimethylamonio]-1-propane-sulfonate)
CO ₂	ogljikov dioksid
CUPRAC	metoda za določanje delovanja antioksidantov z redukcijo bakrovih ionov (ang. Cupric reducing antioxidant power)
DCF	diklorofluorescin (ang. dichlorofluorescin)
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	metoda za določanje antioksidativnega delovanja z uporabo stabilnega radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (ang. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
DTT	ditiotreitol
ET	reakcija prenosa elektrona (ang. Electron Transfer)
EDTA	etilendiamin tetraacetat
FRAP	metoda za določanje delovanja antioksidantov z redukcijo železovih ionov (ang. Ferric reducing antioxidant power)
FS	fenolne spojine
GAPDHc	glikolitični encim gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (ang. glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GC-pari	gvanin-citozin bazni pari
HAT	reakcija prenosa vodikovega atoma (ang. Hydrogen Atom Transfer)
H ₂ DCF	2',7'- diklorodihidrofluorescin
H ₂ DCFDA	2',7'- diklorodihidrofluorescin diacetat
H ₂ SO ₄	žveplova (VI) kislina
H ₃ PO ₄	fosforna(V) kislina
HCl	klorovodikova kislina
IEF	izoelektrično fokusiranje
IPG	imobiliziran pH gradient
JAA	jodacetamid
K ⁺	kalijev kation
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogen fosfat
KHPO ₄	kalijev hidrogen fosfat
LEA	proteini pozne embriogeneze (ang. late-embryogenesis abundant protein)

LC-UV	tekočinska kromatografija, sklopljena z UV-spektrofotometrom
M	mol/L
m ₁	sveža masa lista
m ₂	suha masa lista
m _{nas}	masa lista nasičenega z vodo
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina (ang. messenger ribonucleic acid)
NaCl	natrijev klorid
Na ₂ CO ₃	natrijev karbonat
Na ₂ HPO ₄	dinatrijev-hidrogenfosfat
NaOH	natrijev hidroksid
OD	optična gostota
ORAC	metoda za določanja antioksidativnega delovanja preko absorbance reducentov kisikovih radikalov (ang. oxygen radical absorbance capacity)
PBS	pufer (NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , H ₂ O)
PSII	fotosistem II
PVP	povinilpirolidon
Rastlina A	vzorec prve biološke ponovitve iz listov kontrolne rastline <i>R. nathaliae</i>
Rastlina B	vzorec druge biološke ponovitve iz listov kontrolne rastline <i>R. nathaliae</i>
Rastlina C-D	vzorec prve biološke ponovitve iz listov izsušene rastline <i>R. nathaliae</i>
Rastlina D-D	vzorec druge biološke ponovitve iz listov izsušene rastline <i>R. nathaliae</i>
Rastlina C-R	vzorec prve biološke ponovitve iz listov rehidrirane rastline <i>R. nathaliae</i>
Rastlina D-R	vzorec druge biološke ponovitve iz listov rehidrirane rastline <i>R. nathaliae</i>
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species)
RVV	relativna vsebnost vode
SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
smHSP	mali proteini toplotnega šoka (ang. small Heat Shock Proteins)
SO ₂	žveplov dioksid
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (ang. solid phase extraction)
TBA	tetra-butilamin
TCA	trikarboksilna kislina
Tris-HCl	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol, vodikov klorid
UV	ultravijolična
VV	vsebnost vode
v/v	mL/100 mL
w/v	g/100 mL
w/w	g/g
YEPD	gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov

1 UVOD

V biologiji in medicini predstavlja termin stres vse dogodke okolja, ki presegajo meje ugodnega ter tako posamezen organ oziroma celoten organizem izpostavijo pritiskom okolja. Stresni dejavniki so biotskega ali abiotskega izvora, zaradi katerih so organi višjih rastlin (razen nekaterih izjem), izpostavljeni povečani produkciji reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki povzročajo oksidativne poškodbe celičnih komponent. Proti oksidativnim poškodbam so rastline razvile učinkovite antioksidativne mehanizme (Grassmann in sod., 2002).

Pomanjkanje vode je za rastlino abiotski stres. Večina rastlin je sposobna do neke mere tolerirati sušni stres, vendar je meja tolerance zelo različna med posameznimi rastlinskimi vrstami. Številne med njimi so precej občutljive na sušni stres, saj pomanjkanje vode poškoduje njihove vegetativne organe. Ko relativna vsebnost vode v rastlini pade pod določen odstotek, sčasoma le-ta tudi odmre (Toldi in sod., 2009).

Obstajata pa velika skupina nižjih rastlin (npr. mahovi, lišaji) in majhna skupina višjih rastlin, ki lahko prestanejo daljša sušna obdobja. Ob pomanjkanju vode se njihovi vegetativni deli prav tako izsušijo in rastlina deluje navzven kot mrtva. Ob ponovnem stiku z vodo so te rastline sposobne oživitve, saj lahko popolnoma regenerirajo svoja tkiva, zopet vzpostavijo vse metabolne aktivnosti ter normalno nadaljujejo svoj življenjski cikel. Angleški izraz, ki pojmuje višje rastline s takim odzivom na sušo je 'desiccation tolerant plants' ali redkeje 'resurrection plants', kar bi lahko prevedli z 'rastline, ki tolerirajo izsušitev' oz. 'rastline, sposobne oživitve'. Te rastline vsebujejo splet mehanizmov in metabolnih prilagoditev, ki jim omogočajo preživetje v stanju izsušenosti. Poleg osnovnih rastlinskih prilagoditev na sušo imajo še mehanizme, ki so za posamezne vrste rastlin sposobne oživitve specifični in v veliki meri še nepojasneni (Moore in sod., 2008).

1. 1 OPREDELITEV PROBLEMA

Raziskovali smo antioksidativno delovanje izvlečkov iz listov rastline *Ramonda nathaliae*, ki je kot rastlina sposobna oživitve zanimiv vir bioaktivnih učinkovin. Na podlagi rezultatov proteomskega profila, kjer smo zaznali povečanje oziroma pojav novih proteinov v fazi dehidracije, smo pripravili izvlečke iz liofiliziranih listov sveže (hidrirane) in izsušene (dehidrirane) rastline. Izhodišče za potencialno antioksidativno delovanje nam je podala vsebnost fenolnih spojin v izvlečkih, pripravljenih s topili različnih polarnosti. Njihov antioksidativni vpliv smo nadaljnje preverjali na modelnem organizmu kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* z določanjem znotrajcelične peroksidacije, celične energijske metabolne aktivnosti ter lipidne peroksidacije. Natančnejši vpogled v sestavo rastlinskih izvlečkov, pa nam je podala LC-UV analiza njihovih fenolnih komponent.

1. 2 CILJI NALOGE

- Gojenje *Ramonda nathaliae*, rastline sposobne oživitve
- Izpostavitve rastline suši in rehidraciji ter istočasno pridobivanje vzorcev (kontrolni (hidrirani), dehidrirani, rehidrirani listi) za proteomsko analizo
- Priprava celičnih ekstraktov listov in proteomsko analizo
- Določanje fenolnega profila rastlinskih izvlečkov
- Priprava rastlinskih izvlečkov iz liofiliziranih listov sveže (hidrirane) in izsušene rastline v različnih topilih ter preverjanje njihovega antioksidativnega delovanja

1. 3 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevamo, da bomo na ravni proteoma detektirali in identificirali nekatere obrambne sisteme rastline *Ramonda nathaliae*, ki ji omogočajo preživetje v stanju popolne izsušenosti in ponovno oživitev ob rehidraciji.
- Predpostavljamo, da rastlina v fazi popolne izsušitve vsebuje več kemijsko različnih bioaktivnih učinkovin (npr. fenolnih spojin), ki ji omogočajo preživetje.
- Predvidevamo, da bomo z uporabo topil različne polarnosti pridobili rastlinske izvlečke z učinkovinami (ovrednotene po vsebnosti fenolnih spojin) z različnim antioksidativnim delovanjem na modelni organizem kvasovke.
- Predvidevamo, da bo vidna razlika v antioksidativnem delovanju izvlečkov iz izsušenih (dehidriranih) in svežih (hidriranih) listov rastline na modelni organizem kvasovke.

2 PREGLED OBJAV

2. 1 RASTLINE KOT VIR BIOAKTIVNIH UČINKOVIN

Pred približno 200 leti je odkritje morfija v vrtnem maku pomenilo začetek raziskovanj rastlinskih metabolitov, ki so bila predvsem usmerjena v izolacijo in določanje strukturnih lastnosti novo-odkritih rastlinskih produktov. Ta so imela velik vpliv na razvoj sodobne organske kemije in farmacevtske industrije ter postavila temelje za biološke raziskave rastlinskih sekundarnih metabolitov (Hartmann, 2007). V sredini 20. stoletja se je namreč z razvojem nekaterih analitskih tehnik, kot je kromatografija, pričelo odkrivanje novih metabolitov in postavljanje začetkov nove raziskovalne veje: fitokemije. S pomočjo novih dognanj na področjih biokemije in molekularne biologije pa so uspeli pokazati, da so sekundarni metaboliti nepogrešljivi pri prilagajanju rastlin na določeno okolje. Dokazana je bila tudi njihova antibiotična, antifungocidna in protivirusna aktivnost, ki rastlini omogoča učinkovito obrambo pred patogeni. Nekateri metaboliti lahko preprečujejo kalitev ali pa so toksični do drugih rastlin in živali, kot so insekti (Bourgard in sod., 2001).

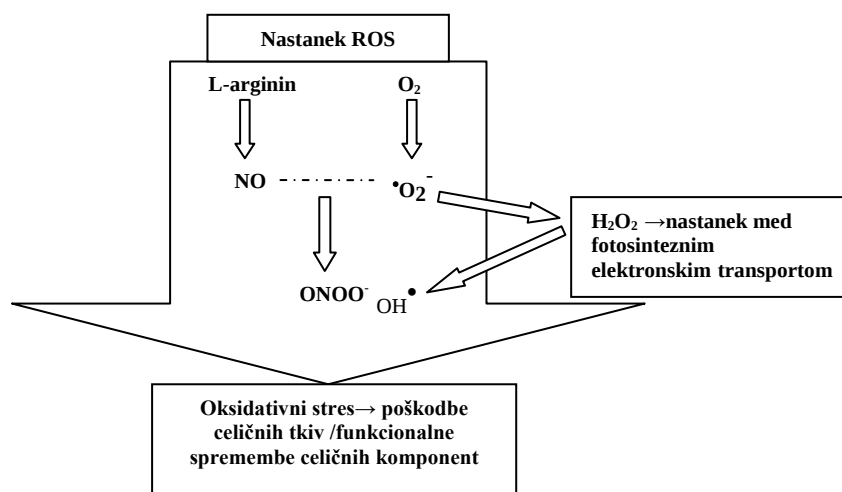
Vendar pomena sekundarnih metabolitov za rastline dolgo časa niso poznali, saj so bili v petdesetih letih prejšnjega stoletja še vedno prepričani, da so le metabolni ostanki ali produkti detoksifikacije (Peach, 1950; Reznik, 1960). To prepričanje se je spremenilo v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja skupaj z razvojem biokemijskega znanja na področju sekundarnega metabolizma. Od takrat naprej vemo, da sekundarni metaboliti niso neaktivni končni produkti, temveč dinamične komponente rastlinskega metabolizma (Bartz in Köster, 1980).

Rastlinske sekundarne metabolite lahko razvrstimo glede na njihove biosintetske poti, in sicer jih tako ločimo na tri velike skupine molekul: fenoli, terpeni in steroidi ter alkaloidi. Fenoli so na primer vpleteni v biosintezo lignina in so široko razširjeni metaboliti ter zastopani v večini višjih rastlin. Alkaloidi pa so manj pogoste sekundarne komponente pri rastlinah in so značilni le za določene rastlinske rodove in vrste (Harborne, 1999). Rastlinski sekundarni metaboliti so biološko aktivne učinkovine, in so zato bili že stoletja uporabljani v tradicionalni medicini. Sedaj pa so pomembne sestavine farmacevtskih, kozmetičnih, kemijskih in nutritivnih pripravkov (Payne in sod., 1991).

Glede na funkcijo delovanja lahko rastlinski metabolizem razdelimo na primarni metabolizem, ki združuje vse esencialne procese za rast in razvoj ter na sekundarni metabolizem, ki je zadolžen za preživetje rastlin v okolju kjer se nahajajo. Z nenehno spreminjajočim okoljem se tudi komponente sekundarnega metabolizma modificirajo in s tem prilagajajo različnim spremembam okolja (Hartmann, 2007).

2. 1. 1 Vpliv stresnih dejavnikov na proizvodnjo sekundarnih metabolitov rastlin

Stres pri rastlinah lahko povzročijo biotski dejavniki, različni za rastlino patogeni organizmi, insekti ali druge rastline, ali pa abiotški stresorji, kot so mraz, UV sevanje, radioaktivno sevanje, onesnažila v zraku (ozon, SO_2), suša in drugi. Rastlina prične ob izpostavljenosti obremenilnim dejavnikom intenzivneje kopičiti ROS (Grassmann in sod., 2002), kot prikazuje slika 1. Ti pa ne nastajajo le pod stresnimi pogoji, temveč nastajajo tudi med normalnim rastlinskim metabolizmom (Rich in Bonner, 1978; Sakihama in sod., 2002). Velika večina ROS nastane med fotosinteznim elektronskim transportom (Asada in Nakano, 1978), saj med tem procesom lahko iz superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$) nastane vodikov peroksid (H_2O_2) (Asada, 1994). Slednji lahko za razliko od drugih ROS (npr. superoksid, hidroksilni radikal, peroksinitrit) difundira preko membran, kar mu omogoča njegova visoka stabilnost in membranska permeabilnost (Foyer, 1993).



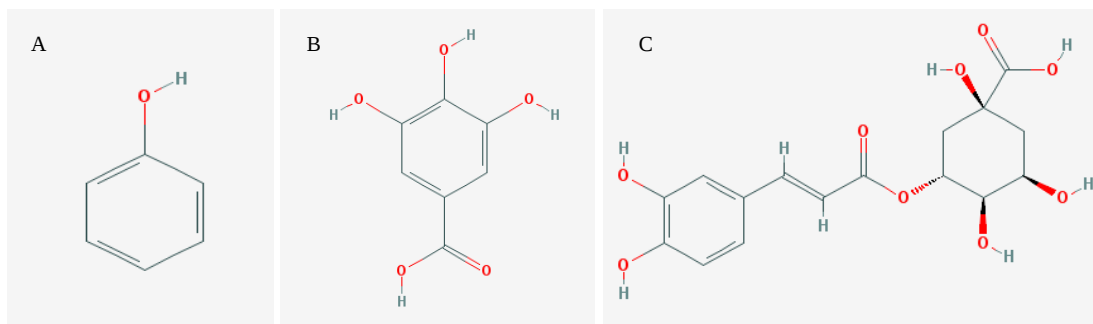
Slika 1: Shematski prikaz nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti (Al-Gubory in sod., 2010: 1636)

ROS lahko difundirajo iz celice in poškodujejo okoliška tkiva bodisi reagirajo s celičnimi makromolekulami, kot so lipidi, proteini, nukleinske kisline ali ogljikovi hidrati (Halliwell, 1999; Grassmann in sod., 2002). Posamezni radikali so zelo reaktivni in delujejo na različne tarče v celici; hidroksilni radikal ($\text{OH}^{\bullet}$), peroksinitrit ($\text{ONOO}^{\bullet}$), radikal dušikovega oksida (NO). Če reagirajo z nukleinskimi kislinami lahko povzročijo modifikacije nukleotidov, zlome enoverižne DNK ter navzkrižne povezave. Modifikacije proteinov lahko rezultirajo v različnih strukturnih ter funkcijskih spremembah. Vendar so za poškodbe ROS najbolj dovzetne membrane in znotrajcelični organeli, saj so večinoma sestavljeni iz nenasičenih maščobnih kislin prisotnih v membranskih fosfolipidih. ROS povzročijo lipidno peroksidacijo membran, kar vpliva na fluidnost membrane in na aktivnost membranskih proteinov (receptorji, prenašalci). S tem se zmanjša stabilnost celične membrane, ki ne more več pravilno vzpostavljati ionskega ravnovesja v celici (Grassmann in sod., 2002).

Ko količina ROS med stresom prekomerno naraste, se mora rastlina pred njimi ustrezno zaščititi z uporabo že obstoječih ali novo sintetiziranih komponent (Grassmann in sod., 2002). Odstranjuje jih lahko preko antioksidativnega sistema, ki vključuje ne-encimske

komponente (lovilci ROS) z nizko molekularno maso (askorbat, glutation, α -tokoferol, kartoenoidi, in fenilpropanoidi), ki so v intrakciji z številnimi encimi, kot so superoksid-dismutaza, katalaza, peroksidaze, glutation-reduktaza, ter askorbat-peroksidaza (Rao, 1996; Bowler in sod., 1994; Creissen in sod., 1994). Naslednji pomemben rastlinski mehanizem vključuje encime, ki so zadolženi za popraviljanje že nastalih poškodb s strani ROS. Ti odstranjujejo odpadne produkte ter rekonstruirajo izgubljene funkcije tekom stresa (Niki, 2010).

Predpostavljajo, da so fenoli kot t.i. lovilci, rezervna obramba pred ROS takrat, ko je rastlinski antioksidativni sistem preobremenjen (Yamasaki in sod., 1995; Yamasaki in sod., 1999). Tako med približno 50.000 sekundarnimi rastlinskimi metaboliti prednjačijo fenolne spojine, ki omogočajo rastlini ustrezno prilagajanje okolju v katerem se nahajajo (Király, 2000). Gre za spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč, na katerega je vezana najmanj ena –OH skupina (slika 2). V kolikor imajo fenoli več –OH skupin vezanih na enega ali več aromatskih obročev, jih imenujemo polifenoli (Vermerris in Nicholson, 2008).



Slika 2: Strkturne formule fenola (A), galne kisline (B) in klorogenske kisline (C) (NCBI, 2011)

Njihova struktura jim omogoča lovljenje radikalov in keliranje kovinskih ionov (Bors in sod., 1996). Gre za pestro skupino molekul, ki jih delimo v različne skupine glede na njihovo kemijsko strukturo, substituentne v osnovni strukturi, povezavo z ogljikovimi hidrati in stopnjo polimerizacije (Abram, 2000).

2.2 ODZIV RASTLIN NA SUŠNI STRES

Suša je za rastlino eden najbolj škodljivih stresorjev, saj ji povzroča številne biokemijske in biofizikalne poškodbe. Sušni stres na celičnem nivoju povzroči spremembe prostornine celice in membranskih proteinov v lipidnem dvosloju, kar privede do porušanja membranske celovitosti in selektivnosti. Hkrati se lahko zmanjša aktivnost celičnih proteinov. Posledice sprememb v strukturi membrane ter v konformaciji makromolekul privedejo do metabolnega in strukturnega neravnovesja, ki se lahko odrazi tudi v kopičenju prostih radikalov, ki nadalje negativno vplivajo na celične strukture in metabolizem (Bartels in Sunkar, 2005).

Rastline se na sušo odzovejo na različne načine. S hitrim fenološkim razvojem, razvojno plastičnostjo ter podaljšanjem dormance semen se lahko izognejo pomanjkanju vode, ali pa sušni stres tolerirajo. Slednji način vključuje različne mehanizme odziva in preživetja (Nielsen in Orcutt, 1996).

Vse rastline lahko do določene mere tolerirajo sušni stres. Glede na zmožnost prilagoditve na hudo pomanjkanje vode jih lahko razdelimo na dve skupini:

- na izsušitev tolerantne rastline, ki lahko preživijo s 4-13 % relativno vsebnostjo vode (RVV) v svojih vegetativnih tkivih
- na izsušitev občutljive rastline, za katere je za uničenje njihovih vegetativnih organov dovolj, da jim relativna vsebnost vode pade pod 20-50 % (Toldi in sod., 2009).

V nadaljevanju bodo opisane lastnosti ter mehanizmi na izsušitev tolerantnih rastlin med katere uvrščamo tudi *Ramonda nathaliae*.

2.2.1 Rastline sposobne oživitve (rastline tolerantne na izsušitev)

Odpornost na izsušitev je značilna predvsem za nižje rastline, kot so alge, lišaji in mahovi, ki imajo zelo malo fizioloških in morfoloških mehanizmov za prilagajanje sušnemu stresu. Zato se v primeru velikega pomanjkanja vode izsušijo in preidejo v anabiozo. V takem stanju lahko preživijo določen čas, ob ponovni navlažitvi pa se njihov metabolizem povrne v stanje karakteristično za rastline, ki so preskrbljene z vodo (Oliver in sod., 2000). Pri višjih rastlinah pa je odpornost na izsušitev omejena na majhno število posameznih rastlin, ki so neenakomerno in redko porazdeljene med družinami višjih rastlin. Pogosto jih imenujejo rastline sposobne oživitve (angleško resurrection plants). Trenutno poznani predstavniki takih rastlin obsegajo 0,2 % celotne flore, vendar se ta odstotek nenehno povečuje (Porembski in Barthlott, 2000).

Rastline lahko na podlagi sposobnosti uravnavanja vodnega režima v tkivih razdelimo na homoiohidrične in poikilohidrične. Poikilohidrične rastline spreminjajo vsebnost vode v svojih tkivih glede na vodno stanje okolja v katerem se nahajajo, medtem ko homoiohidrične vzdržujejo razmeroma stabilno vlažnost svojih tkiv (Stevanović in Janković, 2001). Poikilohidrične rastline načeloma delujejo kot homoiohidrične vse dokler ne prične primanjkovati vode v okolju. Takrat se njihovi vegetativni deli izsušijo v nekaj urah oziroma dneh. Rastline namesto odmiranja in pospešenega formiranja semen, vključijo mehanizme, ki jim omogočajo preživetje izsušenega vendar še vedno živega vegetativnega stanja (Toldi in sod., 2009).

Poikilohidrične rastline so bolj zastopane med nižjimi rastlinami. Med višjimi rastlinami so poikilohidrične rastline izjema. Kot rečeno, iz suhega stanja med rehidracijo zopet oživijo, to pa omogočajo posebni mehanizmi ustrezne zaščite njihovih vegetativnih tkiv v suhem stanju in v prvih fazah rehidracije. Gre za kombinacijo genetskega mehanizma, metabolnega in antioksidativnega sistema, makromolekularnih ter strukturnih prilagoditvenih procesov (Moore in sod., 2008). Te rastline so v svojem življenjskem ciklu sposobne preživeti več obdobjih dehidracije/rehidracije pri katerih se morajo soočiti s pomanjkanjem vode in z osmotskim, mehanskim ter oksidativnim stresom (Bartels, 2005). Največja diverziteta teh rastlin obstaja v južni Afriki, kjer je bilo opravljenih veliko raziskav na tem področju. Tam najdemo vrste kot so *Myrothamnus flabelifolia*, *Craterostigma plantagineum*, *Craterostigma wilmsii*, *Xerophyta viscosa*, *Xerophyta humilis*, *Eragrostis nindensis* in *Sporobolus stapfianus* (Moore in sod., 2008).

2.2.1.1 Prilagoditveni mehanizmi rastlin sposobnih oživitve na sušo/izsušitev

Pomanjkanje vode sproži v rastlinah tolerantnih na izsušitev mehanizme odziva, ki so v veliki meri podobni prilagoditvenim mehanizmom odziva na sušo pri ostalih rastlinah. Vendar je strategija rastlin sposobnih preživetja dehidracijsko-rehidracijskih ciklov veliko bolj učinkovita, zlasti glede zmožnosti omejevanja celičnih poškodb, vzdrževanja integritete membran, sposobnosti hitre in učinkovite vzpostavitve popravljivih mehanizmov med rehidracijo ter v zmanjševanju produkcije prostih radikalov (Oliver in sod., 2000; Oliver in sod., 2005).

V odzivu rastlin na sušni stres ima pomembno vlogo abscizinska kislina (ABA), ki deluje kot signalna molekula in aktivator mnogih genov. Pri nekaterih na izsušitev tolerantnih rastlinah, ki niso bile izpostavljene suši vendar tretirane z abscizinsko kislino, so se sintetizirali številni za sušni stres značilni proteini (Bartels in sod., 1990). Sicer pa so mehanizmi prenosa signalov pri rastlinah sposobnih oživitve še vedno precej nepojasneni, saj so bili raziskovani le pri nekaterih vrstah (Moore in sod., 2008). Znano pa je, da pri njihovem odzivu na sušo ABA ni vedno ključna signalna komponenta. Tako so na primer odkrili povečano sintezo fosfolipidnih signalnih molekul pri prvih odzivih rastline *Craterostigma plantagineum* ob izpostavljenosti suši. V prvih stopnjah odziva na sušo se pri tej rastlini aktivira fosfolipaza D, ki pa ni inducirana s strani abscizinske kisline, ki je značilna pri večini na sušo tolerantnih rastlin, temveč s strani sekundarnih fosfolipidnih metabolitov (Frank, 2000).

Eden izmed pomembnih zaščitnih mehanizmov ob pomanjkanju vode je pri vseh rastlinah, tudi pri tistih tolerantnih na izsušitev, osmotsko prilagajanje. S kopičenjem znotrajceličnih topljencev je omogočen stalen pritok vode v celico. Glavno vlogo v regulaciji turgorja imajo anorganski topljenci, kot so kalij, natrij in klor (Ghoulam in sod., 2002). Med pomanjkanjem vode naraščajo tudi organski topljenci, kot so sladkorji, aminokisline (prolin), kvartarne amonijeve spojine in organske kisline (Ghoulam in sod., 2002; Gilbert in sod., 1998; Milone in sod., 1999). Topljenci prisotni v membranah pa stabilizirajo zvite proteinske strukture, kar omogoča zaščito encimskih aktivnosti med kopičenjem koncentracije ionov tekom izsuševanja (Low, 1985).

Nereducirajoči sladkorji (saharoza, rafinoza, trehaloza) so pomembne komponente rastlinskega odziva na pomanjkanje vode, saj obvarujejo membrane in proteine ter pri rastlinah odpornih na izsušitev inducirajo reverzno imobilizacijo citoplazme (t.i. vitifikacija), ki posledično postane zelo viskozna (Buitink in Leprince, 2004). Saharoza je najverjetneje tista, ki stabilizira celice z direktno povezavo z makromolekulami in membranami, kot tudi z vitifikacijo. Formira nekakšen film okrog proteinskih struktur, ki na ta način ohranjajo stabilnost tudi v sušnem stanju (Buitink in Leprince, 2004).

2.2.2 Študije proteinov pri rastlinah tolerantnih na izsušitev

Več študij je pokazalo na proteinske spremembe med posameznimi fazami izsušitve in rehidracije. Poročali so, da se je med sušo v listih *R. serbica* kar za pet do šestkrat povečala količina topnih proteinov v primerjavi s kontrolnimi, normalno hidriranimi listi. SDS-PAGE

analiza teh proteinov pri 20 % in 50 % vsebnosti relativne vlage je pokazala pojav novih polipeptidnih lis, velikosti okrog 25 kDa in 35 kDa (Veljovic-Jovanovic in sod., 2006). Pojav teh razlagajo kot posledico proteolize zaradi oksidativne modifikacije proteinov med izsuševanjem (Davies in sod., 1987) ali kot *de novo* sintezo proteinov, saj se je v tem času zmanjšala tudi količina aminokislin v listih (Zivkovic in sod., 2005).

Za sušni stres specifični proteini imajo pomembno vlogo pri celični zaščiti in okrevanju tako nižjih kot višjih rastlin tolerantnih na izsušitev ter so pomembni za razumevanje rastlinskih mehanizmov pri odzivu na sušo (Farrant in sod., 1993; Oliver in sod., 2000). Iz listov na izsušitev tolerantne rastline *C. plantagineum* so izolirali številne cDNK klone, ki so povezani z LEA proteini pozne embriogeneze (angl. Late Embryogenesis Abundant proteins - LEA proteini), ki so odvisni od ABA ter z dehidrini, ki spadajo med LEA proteine (Bartels in sod., 1993; Ingram in Bartels, 1996). LEA proteini so, kot ime pove, predvsem karakteristični za pozno embriogenezo pri večini rastlin. Prisotni niso le v vegetativnih tkivih rastlin odpornih na sušo, temveč tudi v vegetativnih delih nekaterih drugih rastlin. Predstavljajo približno 4 % celičnih proteinov, največ pa se jih izraža med izsuševanjem (Roberts in sod., 1993; Huges in Galau, 1989). Izrazijo se tudi ob izpostavljenosti mrazu, osmotskemu stresu, dodani abscizinski kislini ali pa se kontinuirano izražajo (Wise in Tunnacliffe, 2004). Predvidevajo da celične strukture na več načinov ščitijo pred učinki zaradi izgube vode: z delovanjem kot hidratacijski pufer, s prerazporejanjem ionov, z direktno zaščito proteinov ali membran ali z zvijanjem razvitih proteinov (Cumming, 1999). Geni za sintezo LEA proteinov se pričnejo aktivirati pri na sušo tolerantnih kot tudi na izsušitev tolerantnih rastlinah, ko vsebnost vode v njihovih tkivih pade pod 65 %. LEA proteini naj bi varovali rastline le pri vsebnosti vode večji kot blizu stanja izsušitve, vendar so bili predmet raziskovanja tudi pri rastlinah z nižjo vsebnostjo vode (Illing in sod., 2005).

Vloga LEA proteinov je večstranska. Poleg zgoraj opisanih funkcij naj bi LEA proteini ščitili tudi DNK, stabilizirali citoskeletne filamente ter delovali kot molekularni šaperoni (Wise in Tunnacliffe, 2004). Poleg tega je bilo dokazano, da LEA proteini lahko sodelujejo z nekaterimi sladkorji, kot je na primer trehaloza ter nato skupno preprečijo agregacijo proteinov med dehidracijo (Goyal in sod., 2005). V listih rastline *X. humilis* se je med dehidracijo aktiviralo 16 različnih LEA genov, ki imajo različne funkcije med izsušitvijo (Collett in sod., 2003). Poleg omenjene stabilizacijske in zaščitne vloge proteinov ter membran so nekateri LEA proteini tarčno usmerjeni tudi v zaščito nekaterih organelov in celičnih struktur (Rohrig in sod., 2006). Pri mahu *T. ruralis* pa naj bi LEA proteini sodelovali pri okrevanju med rehidracijo, natančneje, sodelovali naj bi pri stabilizaciji oziroma rekonstrukciji membran (Deng in sod., 2003; Oliver in sod., 2005). Pomembno vlogo pri zaščiti membran pred izsuševanjem imajo, poleg LEA proteinov, tudi nekatere druge molekule, kot so manjši proteini toplotnega šoka (angl. heat shock proteini - smHSPs) ter polifenoli, ki imajo podobno funkcijsko vlogo kot LEA proteini (Priteo-Dapena in sod., 2008; Moore in sod., 2005a). Odkritje teh dveh tipov molekul kaže, da morebiti obstajajo še nekatere druge, nepoznane komponente, ki bi lahko izboljšale zaščito rastlinskih membran med izsušitvijo (Moore in sod., 2008).

Poleg zgoraj omenjenih mehanizmov se med procesi izsušitve in ponovne oživitve aktivirajo tudi nekateri drugi mehanizmi, ki varujejo celico pred strukturnimi in funkcijskimi spremembami. Dehidrini, kot smo že omenili spadajo med LEA proteine

(družina D11), so tako vključeni v kontrolo in zaščito konformacij normalno delujočih encimov in nekaterih strukturnih proteinov. Gre za skupino termostabilnih, vodotopnih proteinov (Close, 1997; Rinne in sod., 1999).

Pri preučevanju proteinskih profilov *R. serbica* z 2-D elektroforezo so bile v fazi popolne izsušitve opazne spremembe v primerjavi z proteinskim profilom kontrolnih rastlin, saj je bilo vidnih veliko število novih proteinov. Posamezne med njimi so skušali identificirati, vendar primerjava njihovih aminokislinskih zaporedij z že znanimi ni dala pozitivnih rezultatov, ker so verjetno zelo specifični (Franko, 2010). Identificirali so le veliko podenoto Rubisco, katere vsebnost se v listih izsušene rastline močno poviša v primerjavi s kontrolno rastlino.

2.2.3 Antioksidativni sistem rastlin sposobnih oživitve

Identificiranih je bilo veliko mRNK molekul ter proteinov, ki bodisi zavarujejo fotosintezni aparat bodisi prilagajajo metabolizem trenutnim okoliščinam med fazami dehidracije in rehidracije (Farrant in sod., 2003; Norwood in sod., 2000). Homoiklorofilne rastline sposobne oživitve lahko med izsušitvijo ohranijo svoje pigmente, medtem ko jih poikloiklorofilne rastline zmanjšajo ter resintetizirajo med rehidracijo (Moore in sod., 2008; Farrant in sod., 2003). Pomembno je omeniti, da se pri homoiklorofilnih rastlinah lahko pogosteje pojavijo oksidativne in metabolne poškodbe, ki so posledica še vedno aktivnega fotosistema in nekaterih neaktivnih metabolnih procesov (Illing in sod., 2005). Da bi se izognile takšnim poškodbam, so rastline tekom evolucije razvile encimske in ne-encimske antioksidativne mehanizme (reduciran glutation, askorbinska kislina, tokoferoli), ki so jih preučevali pri več rastlinah sposobnih oživitve ter potrdili hipotezo, da univerzalnega antioksidativnega obrambnega mehanizma ni, temveč ima vsaka rastlina sebi specifičnega (Farrant, 2000).

Vlogo antioksidativnega sistema pri rastlinah sposobnih oživitve so natančneje spremljali pri *M. flabellifolia*. Rastlino so za več kot devet mesecev izpostavili suši ter nato opazovali vsebnost njenih antioksidantov. Najzanimivejša je bila vsebnost polifenolov, ki naj bi delovali kot nekakšen rezervoar, ki posredno določa koliko časa je lahko rastlina izpostavljena izsušitvi. Vsebnost polifenolov je namreč korelirala s trajanjem izsušitvenih dob med različnimi populacijami rastlin *M. flabellifolia* (9 mesecev v Južni Afriki ter 2 – 3 leta v Namibiji), po katerih je rastlina še vedno sposobna povrniti svoje vegetativne dele v življenje (Moore in sod., 2005a; Moore in sod., 2005b). Antioksidativni pomen fenolnih antioksidantov in polifenolov za rastline sposobne oživitve so potrdili tudi na balkanski avtohtoni rastlini *Ramonda serbica* (Sgherri in sod., 2004).

2.3 RASTLINE RODU *Ramonda*

Rod *Ramonda* uvrščamo v subtropsko družino *Gesneriaceae*, v katero spadajo poleg omenjenega še dva roda, ki skupno vsebujejo pet vrst rastlin sposobnih oživitve. V rod *Ramonda* spadajo tri sorodne vrste: *Ramonda serbica* Panč., *Ramonda nathaliae* Panč. et

Petrov. in *Ramonda myconi* (L.) Reich. So redke višje rastline, ki tolerirajo izsušitev in rastejo na severni polobli. Prvi dve vrsti najdemo le na območju jugovzhodne Evrope, *R. myconi* pa na Iberskem polotoku (Kosanin, 1921; Siljak-Yakovlev in sod., 2008). *R. nathaliae* in *R. serbica* sta endemični vrsti na Balkanskem polotoku in uspevata večinoma na severnih straneh apnenčastih sotesk ter na nekaterih gorskih pobočjih (Stevanović in sod., 1991). Na splošno predstavljajo taka področja za rastline večjo izpostavljenost skrajnim okoljskim pogojem, ki pa jih ramonde uspešno preživijo z edinstvenim odzivom na sušo. Te rastline lahko vstopijo v stanje popolne izsušenosti večkrat v svojem življenjskem ciklu. Pri tem skoraj ustavijo svoj metabolizem vendar hkrati vzdržujejo sposobnost vzpostavitve vseh bioloških aktivnosti po rehidraciji (Stevanović in sod., 1992).

Vrsti *R. nathaliae* in *R. serbica* so odkrili v začetku 19. stoletja. Od takrat naprej poteka tudi raziskovanje teh rastlin na večih področjih. Iz genomskega vidika se sicer med seboj sorodne vrste precej razlikujejo. *R. nathaliae* in *R. myconi* sta diploidni vrsti ($2n=48$) in imata trikrat manjši genom v primerjavi s sorodno *R. serbica*, ki je heksaploidna ($2n=144$). *R. nathaliae* ima med tremi vrstami največjo vsebnost GC-nukleotidnih parov (42, 06 %). Zanimivo je, da se vrsti *R. serbica* in *R. nathaliae* lahko med seboj križajo, pri čemer hibridi prevzamejo morfološke lastnosti *R. serbica* (Siljak-Yakovlev in sod., 2008).

Pri ramondah so najzanimivejše raziskave med procesi izsuševanja in ponovne oživitve. Največ raziskav na tem področju je bilo opravljenih pri *R. serbica*. Med izsuševanjem, ko preidejo rastline v stanje anabioze ter med rehidracijo, ko morajo zopet hitro vzpostaviti vse metabolne procese, je vključenih veliko različnih mehanizmov, ki še vedno niso popolnoma pojasnjeni.

Med ciklom dehidracije/rehidracije se pri obeh vrstah spreminja vsebnost lipidov in maščobnih kislin. Že na splošno imajo ramonde v primerjavi z ostalimi kritosemenkami manjšo vsebnost celokupnih lipidov, kar kaže na manjšo količino membranskega materiala. Ob pomanjkanju vode se količina lipidov v listih znatno zmanjša, med rehidracijo pa poteka hitra resinteza in povrnitev membranske sestave v prvotno stanje. Sestava membran se med sušo in rehidracijo tudi med samima vrstama razlikuje (Stevanović in sod., 1992) natančneje pa je bila raziskana pri *R. serbica*. Ta je med izsušitvijo izgubila kar 75 % svojih plazemsko-membranskih lipidov, ki pa jih je med oživitvijo ponovno pridobila. Med prisotnimi prostimi steroli je bila v hidriranih listih velika vsebnost holesterola, ki se je med dehidracijo kar dva-krat povečala (Quartacci in sod., 2002). V splošnem naj bi zmanjšanje celokupnih lipidov med dehidracijo pomenilo zmanjšanje celotnega membranskega prostora v celicah, kar lahko spremeni specifične interakcije med lipidi in membransko povezanimi proteini in posledično omogoča vzdrževanje membranske obstojnosti (Hernandez and Cooke, 1997). Za vzdrževanje permeabilnosti in fluidnosti membran ima pomembno vlogo holesterol, predvsem zaradi planarne konfiguracije molekule (Grunwald, 1974).

R. nathaliae in *R. serbica* spadata med homoiklorofilne rastline, saj sta med procesom izsušitve sposobni obdržati bolj ali manj vso količino klorofila, kar jima omogoča hitro vzpostavitev fotosinteze med rehidracijo. S tem pa postaneta bolj dovzetni za produkcijo ROS. Ponovna sinteza klorofila med rehidracijo ni pogojena s svetlobo, kar pomeni, da je za povrnitev fizioloških funkcij ključna predvsem voda (Dražić in sod., 1999; Quartacci in sod., 2002).

Del obrambnih mehanizmov rastlin sposobnih oživitve je tudi osmotsko prilagajanje. Med dehidracijo je pri *R. serbica* narastel osmotski potencial, ki pa ni bil le posledica izgube vode, temveč tudi naraščanja celičnih kompatibilnih topljencev. Njeno osmotsko prilagajanje temelji predvsem na kopičenju anorganskih ionov (večinoma K^+ in Cl^-), saj je to energetsko ugodnejši vir osmolitov v primerjavi s sintezo organskih komponent (Živković in sod., 2005). Dvig koncentracije kalijevih ionov v obdobju rehidracije se sklada s ponovno vzpostavitvijo fotosistema II (PSII), saj le-ta v istem času rehidracije povrne svojo aktivnost (Augusti in sod., 2001). Poleg osmolitske vloge ima kalij tudi funkcijo pri odprtju kanalčkov za prevzemanje CO_2 , potrebnega za fotosintezo.

Vse tri vrste ramond med dehidracijo v listih znižajo koncentracije reducirajočih sladkorjev, kot sta glukoza in fruktoza, kar ima pozitiven učinek v premagovanju sušnega stresa. Velike koncentracije teh sladkorjev lahko vplivajo na strukturo proteinov, povečajo respiracijo in elektronski transport v mitohondrijih. Pretirana energetska produkcija izzove formiranje ROS, ki nato poškodujejo celične membrane (Navari-Izzo in sod., 1999). Med dehidracijo pa v nasprotju z glukozo in fruktozo narašča koncentracija saharoze, ki ima kot stabilizator membran tudi vlogo v osmoregulaciji. Pri *R. serbica* so detektirali tudi oligosaharid rafinozo, ki naj bi s saharozo pripomogla k vitrifikaciji (reverzna imobilizacija citoplazme), ki ohranja stabilnost proteinov tudi v sušnem stanju. V listih *R. serbica* niso zaznali sladkorja trehaloze, ki je sicer značilna komponenta za zaščito membran pri rastlinah sposobnih oživitve (Živković in sod., 2005).

Dehidrini so v rastlini *R. nathaliae* prisotni že v hidriranih listih in naj bi bili pomembni za normalen metabolizem rastlin. Nove skupine dehidrinov se pojavijo v pozni fazi dehidracije (Jovanović in sod., 2011), kjer bi lahko bili zadolženi za zadrževanje vode, za upočasnitev izsuševanja ali za direktno zaščito proteinov (Hara in sod., 2004).

2.3.1 Antioksidativni mehanizmi rodu *Ramonda*

Največ študij antioksidativnih obrambnih mehanizmov med procesi dehidracije in rehidracije je bilo opravljenih na vrsti *R. serbica*. Pri tej vrsti so raziskovali ne-encimsko ter encimsko pogojene antioksidativne mehanizme, ki naj bi bili med seboj tudi povezani. Z merjenjem aktivnosti peroksidaz (POD) in superoksid-dismutaze (SOD) so ocenili redoks stanje rastline tekom sušnega stresa (Sgherri in sod., 2004; Veljović-Jovanović in sod., 2006). V primerjavi s kontrolnimi listi vsebnost askorbata in glutationa med dehidracijo upada, medtem ko v oksidacijsko najbolj stresnem obdobju (srednji fazi dehidracije ter v začetni rehidracijski fazi) naraste ter kasneje tekom rehidracije zopet doseže koncentracije kontrolnih listov (Sgherri in sod., 2004). Med izsuševanjem se spreminjajo tudi nenecimske fenolne komponente v listih. V prvih urah rehidracije je vsebnost fenolov v listih narasla in se hkrati znižala aktivnost peroksidaze ter dveh drugih antioksidativnih encimov: superoksid dismutaze in askorbat peroksidaze. Tekom začetne faze rehidracije je rastlina bila najbolj izpostavljena stresu, saj so se celice osredotočile predvsem na biosintezo, kar je povzročilo večjo produkcijo ROS (Veljović-Jovanović in sod., 2006).

Obrambni oksidacijski mehanizmi tekom izsuševanja pri *R. nathaliae* so bili do nedavnega še popolnoma neznani, saj je večina raziskav v tej smeri potekala pri sorodni *R. serbica*.

Potem pa so Jovanović in sod. (2011) raziskali spremembe oksidativnega stanja med izsušitvenim ciklom tudi za *R. nathaliae*. Z vidika oksidativnega stresa naj bi bili tudi pri *R. nathaliae* najbolj kritični obdobji v srednji fazi dehidracije ter v začetni rehidracijski fazi. V času do zadnje faze dehidracije naj bi celice ustvarile določene učinkovite obrambne mehanizme, ki jim omogočajo preživetje skoraj popolne izgube vode in prehod v stanje anabioze. Prva faza rehidracije, ki predstavlja najbolj stresno obdobje, je povzročila lipidne poškodbe v rastlinah vendar je temu sledilo povečanje antioksidativnih encimov (katalaze (CAT), SOD in POD). S pomočjo le-teh je celica lahko zopet vzpostavila normalen celični metabolizem. Hkrati so na podlagi kopičenja vodikovega peroksida tekom dehidracije/rehidracije predpostavili njegovo vlogo v rastlinskem zaznavanju pričetka izsušitve in posledično sprožitve ustreznih prilagoditvenih mehanizmov.

2.4 METODE ZA UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA BIOAKTIVNIH UČINKOVIN

Oprelitev izrazito dinamičnega sistema, kot je antioksidativni sistem nekega organizma, je zelo zapletena. Enostranske metode, ki bi lahko hkrati opisale ves kompleks mehanizmov antioksidativne obrambe nekega biološkega sistema, ne poznamo (Prior in sod., 2005). Za oceno zmogljivosti antioksidativnih komponent je potrebno ovrednotiti njihovo učinkovitost *in vitro* na plazemsko-lipidni ravni ter *in vivo* z določenimi biomarkerji oksidativnega stresa (Niki, 2010). V nadaljevanju je predstavljenih nekaj pogostejše uporabljenih *in vitro* ter *in vivo* metod za ugotavljanje antioksidativnega delovanja.

2.4.1 Metode *in vitro*

Poznanih je več metod za določevanje učinkovitosti delovanja lovilcev prostih radikalov. Nekateri avtorji jih delijo glede na njihov način delovanja v dve skupini, in sicer na metode, ki temeljijo na reakciji prenosa vodikovega atoma (ang. Hydrogen Atom Transfer) - HAT, in metode, kjer poteka prenos elektrona (ang. Electron Transfer) - ET. Problem nastaja pri uvrščanju metod v posamezno skupino, ker se reakcije v več primerih pojavijo skupaj in je zato težko definirati točen mehanizem delovanja. (Prior in sod., 2005), Tako bodo v nadaljevanju opisane le nekatere pogostejše uporabljene metode, brez uvrščanja v posamezne skupine. Večina metod trenutno temelji na reakciji z določenim referenčnim radikalom, oksidantom ali na kompetenčnih metodah, ki uporabljajo UV / vidno absorpcijsko spektrofotometrijo (Karadag in sod., 2009).

2.4.1.1 Metode, ki temeljijo na reakciji antioksidantov s stabilnimi prostimi radikali

Metode temeljijo na reakciji antioksidantov s prostimi radikali, ki absorbirajo v vidnem delu spektra. Ko antioksidant v reakcijski mešanici reagira s prostim radikalom, nastane neradikalni produkt, ki ima različen (manjši) molarni absorpcijski koeficient v vidnem delu spektra. Iz razlike absorbanc lahko izračunamo za koliko so dodani antioksidanti v testu zmanjšali koncentracijo radikala. Na osnovi eksperimentalnih podatkov lahko v modelnih raztopinah izračunamo kakšno je molarno razmerje med radikalom in antioksidantom.

Vsebnost antioksidantov v kompleksnih mešanica pa lahko ovrednotimo, tako da primerjamo učinek antioksidantov, z učinkom modelnih antioksidantov. Za analizo antioksidativne aktivnosti v vodnih medijih se uporablja kationski radikal $ABTS^{\cdot+}$ (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)), ki je topen tudi v relativno polarnih organskih topilih (Miller in sod., 1993; Re in sod., 1999). Galvinoxilni radikal (Shi in sod., 2001) in DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Butkovic in sod., 1999) sta relativno nepolarne molekuli, zato z njima ne moremo analizirati antioksidativne učinkovitosti v pufrih brez prisotnosti organskih topil. Uporabljata se lahko v mešanici vode in nižjih alkoholov kakor tudi v zelo nepolarnih topilih kot je npr. heksan (Tsuchiyain sod., 1985). Ker se hitrost reakcije antioksidantov z radikali lahko močno razlikuje v odvisnosti od kemijskega okolja in vrste antioksidanta, lahko uporabimo radikale tudi za kinetične študije (Niki, 2010).

2.4.1.2 Metoda za določanje skupnih fenolov z Folin – Ciocalteuovim reagentom

Folin – Ciocalteu reagent vsebuje molibdate (VI) in volframate (VI), ki jih antioksidanti v reakcijski mešanici v alkalnem pH-ju reducirajo do modro obarvanih oksidov, ki imajo velik molarni absorpcijski koeficient pri valovnih dolžinah nm - 765 nm (Magalhaes in sod., 2008). Kljub temu, da natančen mehanizem delovanja reagenta ni poznan, velja metoda za uporabno, enostavno in ponovljivo (Huang in sod., 2005). Primerljiva je tudi z ostalimi metodami za določanje antioksidativne aktivnosti, čeprav naj bi z njo določali predvsem celokupno vsebnost fenolov. Dejstvo pa je, da Folinov reagent ni specifičen zgolj za spojine, ki imajo na aromatskem obroču OH skupino, saj ga lahko reducirajo tudi ostale, ne – fenolne spojine kot sta npr. askorbinska kislina ter glutation (MacDonald-Wicks in sod., 2006).

2.4.1.3 Fluorescenčne metode za določevanje antioksidativne učinkovitosti

Metoda ORAC (»oxygen radical absorbance capacity«) je pogostokrat uporabljena kompetenčna metoda: Metoda temelji na reakciji prostih radikalov in molekul kot sta fluorescein in beta-fikoeitrin, ki fluorescirata v vodnih raztopinah. Ko prosti radikali modificirajo molekule, nastanejo produkti, ki ne fluorescirajo. Proste radikale se v raztopini največkrat generira s termičnim razpadom AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propan)) ali z mešanico Cu^{2+}/H_2O_2 . Če so v raztopini poleg fluoresceina ali beta-fikoeitrina prisotnosti tudi antioksidanti, bodo le ti stabilizirali proste radikale, kar bo rezultiralo v počasnejši modifikaciji fluoresceina ali beta-fikoeitrina, oziroma v počasnejšem zmanjševanju fluorescence (Cao in Prior, 1998; Ou in sod., 2001). Učinkovitost testiranih antioksidantov se največkrat ovrednoti po primerjavi s Trolox-om (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina), ki je vodotopen analog vitamina E.

2.4.1.4 Metode, ki temeljijo na redukciji kovinskih ionov: FRAP, CUPRAC

Z metodama FRAP (»Ferric reducing antioxidant power«) in CUPRAC (»Cupric reducing antioxidant power«) ovrednotimo učinkovitost antioksidantov za redukcijo kovinskih ionov (Fe^{3+} , Cu^{2+}) (Benzie in Strain, 1998; Apak in sod., 2004). Metoda ima tudi mnogo

pomanjkljivosti, saj lahko neustrezno ovrednotimo antioksidativno učinkovitost tistih antioksidantov, ki lahko kompleksirajo kovinske ione. Sposobnost redukcije kovinskih ionov pa tudi ni nujno zagotovilo njihove antioksidativne učinkovitosti, saj reducirani obliki Fe^{2+} in Cu^+ učinkoviteje generirata hidroksilne radikale kot oksidirani obliki ionov (Niki, 2010).

2.4.1.5 Antioksidanti in lipidna peroksidacija

Lipidi, kot so proste in zaestrene polinenasičene maščobne kisline ter holesterol, so primerne tarče za proste radikale. Obstaja več študij, ki prikazujejo, da lipidna peroksidacija povzroča motnje in spremembe v bioloških membranah in nastanku toksičnih produktov. Zato imajo antioksidanti tudi z vidika zaščite lipidnih membran pomembno vlogo (Niki, 2009). Pomembno je omeniti, da zaviranje lipidne peroksidacije s strani antioksidantov nujno ne sovпада z učinkovitostjo antioksidantov pri lovljenju prostih radikalov (Niki, 2010). Obstaja mnogo metod za merjenje lipidne peroksidacije. Lipidno peroksidacijo lahko ovrednotimo na osnovi porabljenega kisika, zmanjšanju koncentracije substrata, nastanka primarnih produktov peroksidacije ali nastanka sekundarnih produktov, ki nastanejo po razpadu peroksidov (Laguere in sod., 2007). Slednjo strategijo smo uporabili tudi pri naši raziskavi, kjer smo lipidne peroksidacije celic določali s TBA (tetra-butilamin) metodo.

2.4.2 Metode *in vivo*

Antioksidativno delovanje v živih sistemih zaobjema več dejavnikov, ki morajo biti upoštevani tudi pri metodah, ko vrednotimo učinkovitost antioksidantov v *in vivo* pogojih. Antioksidant mora v biološki sistem uspešno vstopiti in tam ohraniti stabilnost. Večina dosedanjih študij antioksidativnega delovanja v bioloških sistemih je potekala v človeških in živalskih tkivih, kjer so veliko pozornosti namenili predvsem preučevanju biodostopnosti posameznih antioksidantov, kot tudi učinkom in trajanju njihovega delovanja. Pri tem je pri nekaterih antioksidantih prišlo do velikih razlik med njihovo učinkovitostjo pri *in vivo* in *in vitro* pogojih (Niki in Noguchi, 2004; Niki 2010).

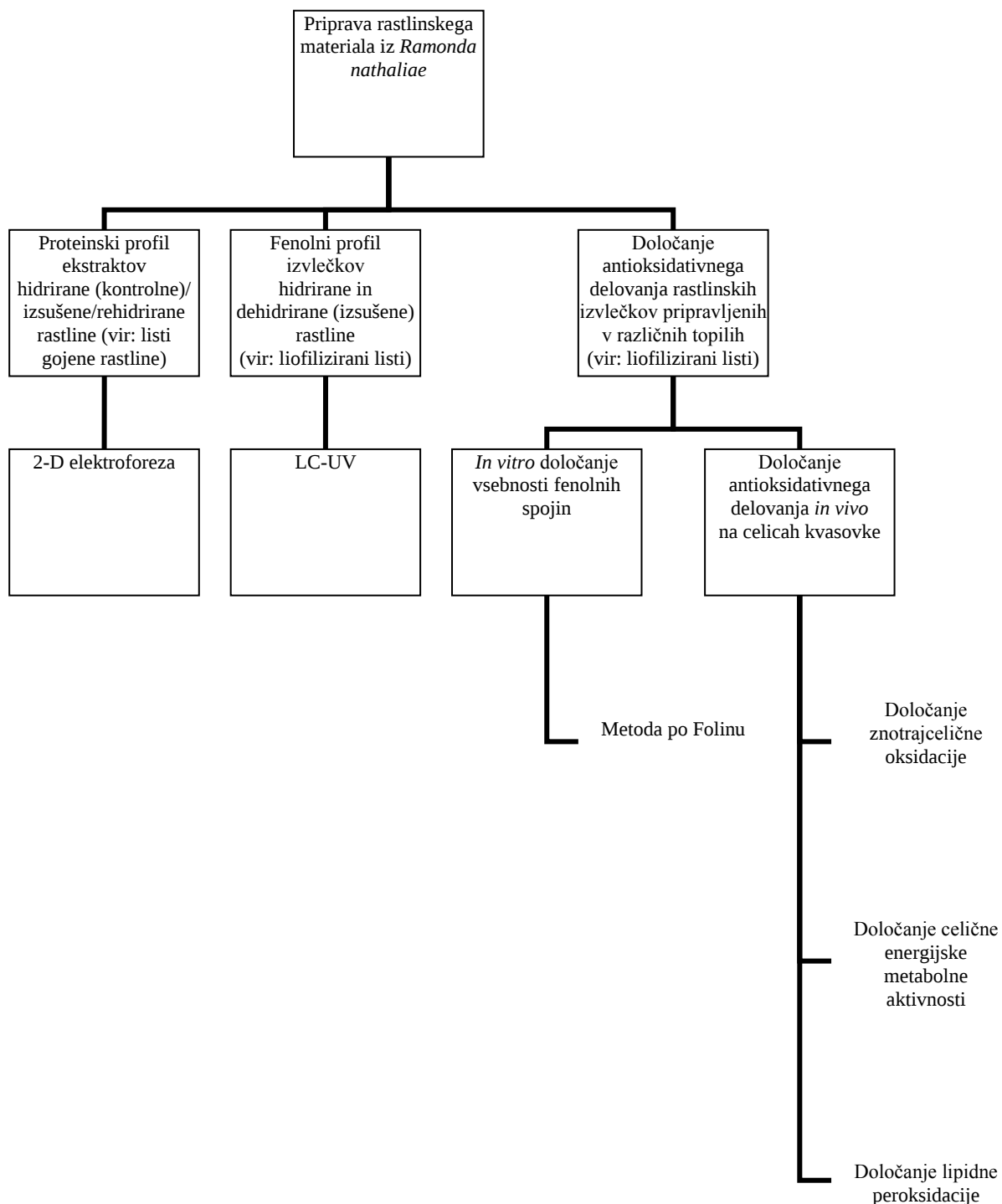
In vivo raziskave, ki potekajo v človeških oziroma živalskih tekočinah in tkivih, kot so plazma, eritrociti, urin, cerebrospinalne tekočine, slina ali solze, uporabljajo t.i. biomarkerje, kot zanesljive pokazatelje oksidativnega stresa. Ustrezni biomarkerji so lahko različne celične komponente ali metabolni produkti, katerim merimo nivo oksidacije *in vivo* (Ohshima in sod., 2002; Voss in Siems, 2006; Dalle-Donne in sod., 2006), kot so na primer oksidacijski produkti lipidov, oksidativno modificirani proteini in sladkorji, zlomi DNK verig ter oksidacijski produkti DNK baz (Niki, 2008; Hawkins in sod., 2009; Rabbani in sod., 2009; Dizdaroglu in sod., 2002). Primerni biomarkerji so lahko tudi sami antioksidanti oziroma njihove oksidirane oblike. Ob povečanju oksidativnega stresa narašča količina oksidiranih oblik glutationa (Dalle-Donne in sod., 2006) ali koencima Q (Yamamoto in sod., 1997), preko katerih ocenijo oksidativno stanje v biološkem sistemu. Antioksidativno delovanje in njihova vloga v *in vivo* sistemih je še vedno precej nepojasnjena, zato je na tem področju potrebnih še veliko raziskav.

2.4.2.1 Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* kot modelni organizem za *in vivo* določanje antioksidativnih učinkovin

Ko kvasnim celicam začne primanjkovati hranil, vstopijo v stacionarno fazo rasti, kjer se nehajo mitotsko deliti in zaustavijo G1 fazo rasti. V stacionarni fazi celice pridobijo nove značilnosti v celični suspenziji, ki so pomembne, da lahko preživijo daljša obdobja. Ustavi se celična delitev, upočasni se metabolizem, celice pričnejo kopičiti ogljikove hidrate v glikogen in poveča se odpornost na okoljske stresne dejavnike (Werner-Wasburne in sod., 1996). V stacionarnih kulturah se individualne kvasne celice starajo, njihova replikativna življenjska doba pa se tekom časa zmanjšuje. Eden izmed glavnih razlogov za celično staranje naj bi bile poškodbe s strani prostih radikalov (Harman, 1956). Tekom inkubacije starih stacionarnih celičnih kultur naraste količina reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so posledica zmanjšane učinkovitosti antioksidativne obrambe. Tako se celice v starejših kulturah pričnejo uničevati (Jakubowski in sod., 1999). Oksidacijske poškodbe, ki nastajajo v stacionarnih kulturah, lahko primerjamo z nedeljivimi celicami vretenčarjev v kulturah oziroma s celicami večceličnega organizma po mitotski delitvi (Sitte in sod., 1998). Po mnenju več avtorjev so lahko stacionarne celične kulture kvasovk modelni sistem za preučevanje oksidativnih poškodb celic višjih evkariontov, ko te prenehajo z mitotsko delitvijo (Ashrafi in sod., 1999; Jazwinski in sod., 1990; Kim in sod., 1996; Zakrajšek in sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 3: Shematski prikaz poteka dela

3.2 MATERIALI

3. 2. 1 Rastlinski material

V okviru diplomskega dela smo uporabljali naslednje izraze za opredelitev listov rastline *Ramonda nathaliae* in njihovih izvlečkov v posameznih fazah dehidracijsko-rehidacijskega cikla:

- sveži listi: listi v hidrirani fazi rastline (kontrolni listi);
 - izsušeni listi: listi v zadnji fazi dehidracije rastline;
 - rehidrirani listi: listi po 48 urah ponovnega vlaženja rastline po fazi izsušitve.
- Listi gojene rastline *Ramonda nathaliae*

Štiri rastline *Ramonda nathaliae* smo pridobili iz njihovega naravnega okolja v jugovzhodni Srbiji, blizu meje z Bolgarijo. Rastline smo nato vzgajali in izpostavili izsuševanju/rehidraciji v rastni komori na Institutu »Jožef Stefan«. Po vzorčenju listov rastlin v posameznih fazah smo rastlinski material hranili pri - 76 °C.

- Liofilizirani listi rastline *Ramonda nathaliae*

Rastlinske izvlečke za *in vitro* ter *in vivo* raziskave smo pripravili iz liofiliziranih listov svežih (hidriranih) in izsušenih rastlin, ki smo jih dobili iz botaničnega vrta Jevremovac (Institut za botaniko, Fakulteta za biologijo, Beograd). Do uporabe smo jih hranili pri -20°C.

3. 2. 2 Mikroorganizem

Modelni organizem za preučevanje antioksidativnega delovanja rastlinskih izvlečkov, je predstavljala kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155. Pridobili smo jo iz zbirke industrijskih mikroorganizmov na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Za izvajanje poskusa smo uporabili tri dni staro kulturo, ki smo jo nacepili na trdno gojišče YEPD ter inkubirali na 28 °C.

3. 2. 3 Gojišča

- Trdno gojišče YEPD

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1996)

Sestavina	Količina (g)	Končna koncentracija (%)
Kvasni ekstrakt (Biolife)	10	1 % (w/v)
Pepton (Biolife)	20	2 % (w/v)
Brezvodna glukoza (Merck)	20	2 % (w/v)
Agar (Biolife)	20	2 % (w/v)
dH ₂ O do 1L		

Gojišče smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Ko se je ohladilo na 45 °C, smo ga razlili v plastične petrijevke ter počakali, da se strdi.

- Tekoče gojišče YEPD

Preglednica 2: Sestava tekočega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1996)

Sestavina	Količina (g)	Končna koncentracija
Kvasni ekstrakt (Biolife)	10	1 % (w/v)
Pepton (Biolife)	20	2 % (w/v)
Brezvodna glukoza (Merck)	20	2 % (w/v)
dH ₂ O do 1L		

Gojišče smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Pred uporabo smo ga ohladili na sobno temperaturo.

3. 2. 4 Raztopine in reagenti

3.2.4.1 Priprava ekstraktov iz listov *Ramonda nathaliae* za proteomsko analizo

- Tekoči dušik
- Pufer za ekstrakcijo proteinov

Preglednica 3: Sestava pufra za ekstrakcijo proteinov

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
Urea (Sigma)	10,5 g	7 M
Tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	1 g	4 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
DTT (Sigma)	0,25 g	1 % (w/v)
Inhibitor proteaz (Complete mini Roche Diagnostic)	1 tableta	
Dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

- Polivinilpirolidon (PVP)

3.2.4.2 Določanje koncentracije proteinov v celičnih ekstraktih listov

- Bradfordov reagent (BioRad Protein Assay)

3.2.4.3 Čiščenje proteinskih ekstraktov

- 2-D Clean Up Kit (GE Healthcare)

3.2.4.4 Proteomska analiza z 2-D elektroforezo

- **Prva dimenzija:**

- Raztopina za rehidracijo IPG trakov

Preglednica 4: Sestava raztopine za rehidracijo trakov

Sestavine	Količina	Končna koncentracija
Urea (Sigma)	10,5	7 M
Tiourea (Sigma)	3,8	2 M
CHAPS (Ge Healthcare)	0,5	2 % (w/v)
IPG pufer (Ge Healthcare)	500	2 % (v/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
Dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

Pripravljen pufer smo hranili v alikvotih po 2 mL, shranjenih pri -20 °C. Pred uporabo smo pufer odtajali na sobno temperaturo ter mu dodali 0,006 g/ 2mL DTT, da je bila njegova koncentracija 18 mM.

- Mineralno olje (Sigma)
- Trakovi z imobiliziranim pH gradientom (pH 3-10, dolžina 13 cm) (GE Healthcare)

- **Druga dimenzija:**

- Ločilni gel

Preglednica 5: Sestavine za pripravo ločilnega gela debeline 1 mm

Sestavine	Količina (za 4 gele)	Končna koncentracija
Raztopina akrilamid 30 % (w/v) / bisakrilamid 0,8 % (w/v)	31,4 mL	12% (w/v)/0,3 % (w/v)
1,5 M raztopina Tris-HCl (pH=8,8)	19,6 mL	0,6 M
10 % raztopina SDS	0,8 mL	4 % (w/v)
ddH ₂ O	26 mL	4 % (w/v)
10 % raztopina APS	390 µL	
TEMED	26 µL	

Raztopino APS in TEMED smo dodali ostalim sestavinam ločinega gela po 10 minutnem razplinjanju na ultrazvočni kopeli. Takoj po dodatku smo vlili gele.

- 1X SDS pufer

Preglednica 6: Sestavine za 1-kratni SDS pufer

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Tris – baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
Glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (w/v)
ddH ₂ O do 1L		

- Osnovni pufer za uravnoteženje

Preglednica 7: Sestavine za pufer za uravnoteženje –osnovni

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl (pH= 8,8)	5 mL	75 mM
Urea (Sigma)	36 g	6 M
Glicerol (Sigma)	30 mL	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2 g	2 % (w/v)
Bromfenol modro – BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
ddH ₂ O do 100 mL		

- Pufer za uravnoteženje I (65 mM DTT)
DTT (Sigma); 0,4 g
Osnovni pufer za uravnoteženje; 40 mL
- Pufer za uravnoteženje II (260 mM jodacetamid)
Jodacetamid (Sigma); 1,92 g
Osnovni pufer za uravnoteženje; 40 mL

Za pripravo pufrov za uravnoteženje I in II smo posamezno zatehtali ustrezno količino DTT ali jodacetamida, ki smo jih raztopili v 40 mL osnovnega pufru za uravnoteženje, kar zadostuje za uravnoteženje štirih IPG trakov.

- Agarozna raztopina

Preglednica 8: Sestavine za pripravo agarozne raztopine

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Agaroz (Sigma)	0,5 g	0,5 % (w/v)
1X SDS elektroforezni pufer	100 mL	
BFM	1 kistalček	

Bromfenol modro dodamo raztopini, ki jo predhodno segrejemo v mikrovalovni pečici, da se agaroz lažje raztopi.

3.2.4.5 Detekcija proteinov na gelu

- ORIOL barvilo (Biorad)
- Metanol (Merck)

3.2.4.6 Priprava izvlečkov liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline *Ramonda nathaliae* za analizo fenolnega profila z LC-UV

- 96 % Etanol (Merck)
- Ocetna kislina (Merck)
- Žveplova(VI) kislina (H_2SO_4) (Carlo Erba)
- Metanol (Merck)

3.2.4.7 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

- Metanol (Merck) za pripravo 15 % (w/v) raztopine metanola

3.2.4.8 Analiza fenolnih spojin z LC-UV

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

3.2.4.9 Priprava rastlinskih izvlečkov iz liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline *Ramonda nathaliae*

- Tekoči dušik
- 96 % etanol (Merck)
- 100 % očetna kislina (Merck)
- Pufer PBS (preglednica 9)
- ddH₂O

3.2.4.10 *In vitro* določanje vsebnosti fenolnih spojin v izvlečkih, pripravljenih z različnimi topili - metoda po Folinu

- Folin – Ciocalteuovim reagent (Sigma)
- Natrijev karbonat (Na₂CO₃) (Merck) za pripravo 20 % (w/v) raztopine natrijevega karbonata

3.2.4.11 *In vivo* določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov, pripravljenih z različnimi topili

- **Priprava suspenzije kvasovk v stacionarni fazi rasti**

- PBS pufer

Preglednica 9: Sestava PBS pufra

Sestavina		Količina	Končna koncentracija
1 tabletko (Oxoid)	NaCl	8,0 g	8 % (w/v)
	KCl	0,2 g	0,2 % (w/v)
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g	1,15 % (w/v)
	KH ₂ PO ₄	0,2 g	0,2 % (w/v)
ddH ₂ O do 100 mL			

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

- **Določanje znotraj-celične oksidacije**

- Kalijev fosfatni pufer (pH = 7,8)

Preglednica 10: Sestava 50 mM K₂HPO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
KH ₂ PO ₄ (Merck)	3,40 g	50 mM
ddH ₂ O do 500 mL		

Preglednica 11: Sestava 50 mM KHPO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
KHPO ₄ (Merck)	4,35 g	50 mM
ddH ₂ O do 500 mL		

50 mM kalijev fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo posamezni komponenti pufra (preglednica 10 in preglednica 11) združili, da je bil končni pH enak 7,8. Pufer smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar ter ga pred uporabo filtrirali preko filtra z velikostjo por 0,2 µm.

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

Preglednica 12: Sestava 1 mM raztopine H₂DCFDA

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
H ₂ DCFDA	0,0049 g	1 mM
96 % Etanol (Merck) do 10 mL		

- **Določanje celične energijske metabolne aktivnosti**

- Komplet »BacTiter-GloTM Micorbial Cell Viability Assay« (ProMega)
- Pufer PBS (Preglednica 9)

- **Določanje lipidne peroksidacije**

- Pufer PBS (Preglednica 9)
- Natrij-kalijev fosfatni pufer (pH = 7,0)

Preglednica 13: Sestava 50 mM Na₂HPO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	3,55 g	50 mM
EDTA (Kemika)	0,0186 g	0,1 mM
ddH ₂ O do 500 mL		

Preglednica 14: Sestava 50 mM KH₂PO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
KH ₂ PO ₄ (Merck)	3,4 g	50 mM
EDTA (Kemika)	0,0186 g	0,1 mM
ddH ₂ O do 500 mL		

Posamezni komponenti pufra (preglednica 13 in preglednica 14) smo združili tako, da je bil končni pH enak 7,0.

- Menadion (Sigma – Aldrich)
- Reagent za določanje lipidne peroksidacije

Preglednica 15: Sestavine reagenta za določanje lipidne peroksidacije

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
TCA (Merck)	1,5 g	1,5 % (w/v)
TBA (Sigma – Aldrich)	0,037 g	0,037 % (w/v)
BHT (Sigma – Aldrich)	0,001 g	0,001 % (w/v)
HCl (Merck)	2,5 mL 1 M	25 mM
ddH ₂ O do 100 mL		

- Cirkonij-kremenčeve kroglice premera 0,5 mm (Biospec Products)
- Butanol (Kemika)

3. 2. 5 Aparature in pribor

3.2.5.1 Gojenje in vzorčenje rastline *Ramonda nathaliae*

- Plastična kadička
- Tehtiči
- Petrijeve plošče
- Eksikator
- Najlonska folija
- Bombažna vata in papirnate brisače
- Tehnica (Sartorius analytic)
- Suhi sterilizator

3.2.5.2 Priprava ekstraktov iz listov *Ramonda nathaliae* za proteomsko analizo

- Terilnice s pestiči
- Plastična žlička
- Plenična predloga
- Lij
- Centrifuga (Sigma)

3.2.5.3 Določanje koncentracije proteinov in čiščenje proteinskih ekstraktov

- 96-prostorne mikrotitrne ploščice za merjenje absorbance (Nunc)
- Čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- Vrtnik TTS2 (Ika)
- Centrifuga (Sigma)

3.2.5.4 2-D elektroforeza

- Prva dimenzija

- Podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- Vrtičnik TTS2 (Ika)
- Centrifuga miniSpin (Eppendorf)
- Filter papir
- Steklen podstavek z elektrodnimi priključki (GE Healthcare)
- Plastična plošča z vdolbinami
- Elektrodni trakovi (GE Healthcare)
- Elektrodi (anoda, katoda)
- Hladilni sistem (GE Healthcare)
- Usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

- Druga dimenzija

- Steklene plošče
- Distančniki (1 mm)
- Nosilci
- Nosilci z vijaki
- Stiščki
- Fen
- Epruvete z zamaški
- Stresalna plošča (Biometra)
- Filter papir
- Mikrovalovna pečica (Sanyo)
- Ultrazvočna kopel (Sonis-Pio)
- Igla
- Zgornja in spodnja SDS-PAGE posoda
- Hladilni sistem (GE Healthcare)
- Usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

3.2.5.5 Detekcija gelov in analiza slike

- Stresalna plošča (Biometra)
- Plastične banjice 19,5 x 20,8 cm (Rotho)
- Sistem za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI-HRA16 (Sygene)
- Računalniški program za obdelavo gelov 2-D Dymension (Sygene)

3.2.5.6 Priprava izvlečkov liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline za analizo fenolnega profila

- Steklene vijale (Supelco)
- Digestorij
- Filter z 0,45 µm velikimi porami
- Suh sterilizator (Memmert)
- Centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- Inekcijske brizge (1mL)

3.2.5.7 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

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

3.2.5.8 Analiza fenolnih spojin z LC-UV

- binarna gradientna črpalka Agilent 1100, G1312A (Agilent Technologies)
- avtomatski podajalnik Agilent 1100, G1330B (Agilent Technologies)
- predkolona Gemini C18 (Phenomenex)
- kolona Ascentis Expres C18, 150 mm × 2,1 mm × 2,7 µm (Supelco)
- DAD Agilent 1100, G1315B (Agilent Technologies)
- program MassLynx 4,1 (Micromass)

3.2.5.9 Priprava izvlečkov in določanje njihovega antioksidativnega delovanja

- Terilnice s pestiči
- Centrifuga (Tehtnica)
- Vrtnik TTS2 (Ika)
- Tehtnica (Sartorius analytic)

3.2.5.10 *In vitro* določanje fenolnih spojin v izvlečkih, pripravljenih z različnimi topili - metoda po Folinu

- 96-prostorne mikrotitrne ploščice za merjenje absorbance (Nunc)
- Čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- Vrtnik TTS2 (Ika)

3.2.5.11 *In vivo* določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov, pripravljenih z različnimi topili

- Inkubator IG 150 (Jouan)
- Parni sterilizator – avtoklav (Sutjeska)
- Brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- 100 mL erlenmajerica s stransko roko in enim utorom (Borosilicat)
- 500 mL erlenmajerica s stransko roko in enim utorom (Simex)
- 1000 mL erlenmajerica s stransko roko in enim utorom (Shot Duran)
- Merilni valj
- Infuzijske steklenice
- Cepilne zanke
- Centrifuga (Tehtnica)
- Centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- Magnetno mešalo MM-540 (Tehtnica)
- Tehnica excellence (Sartorius)
- Tehnica PS 1200/C/2 (Radwag)
- Stresalnik Multitron (Infors HT)
- Termomikser comfort (Eppendorf)
- Spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- pH-meter Seven multi (Mettler Toledo)
- 96-prostorne mikrotitrne ploščice za merjenje absorbance, fluorescence in luminiscence (Nunc)
- Čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- Računalniški program Magellan
- Vrtničnik TTS2 (Ika)
- Inekcijske brizge (1mL)
- Filter s 0,2 µm velikimi porami

3.2.5.12 Potrošna oprema in aparatura za shranjevanje vzorcev

- Stekovina
- Kovinske žličke
- Pipete
- Centrifugirke (1,5 mL, 2 mL, 10 mL, 50 mL)
- Plastične petrijeve posode
- Zmrzovalnik (-20 °C) (LTH)
- Hladilnik (4 °C) (LTH)
- Zmrzovalnik Ultra Freezer (-80 °C) (Heto)

3.3 METODE

3.3.1 Gojenje in vzorčenje rastline *Ramonda nathaliae*

Štiri rastline *Ramonda nathaliae* smo po prenosu iz naravnega okolja vzgajali v rastni komori na Institutu »Jožef Stefan« v Ljubljani pri kontroliranih pogojih (16 urna osvetljenost z močjo $121,3 \text{ W/m}^2$, temperatura je bila $21\text{--}23 \text{ }^\circ\text{C}$, relativna vlažnost zraka je bila na začetku eksperimenta $70\text{--}80\%$, po prenehanju zalivanja pa okrog 40%). Ramonde smo skupaj z zemljo, v kateri so rasle, položili v plastične kadičke, ki smo jih predhodno obložili s peskom in zemljo. Rastline smo nato še obložili z mahom, očistili s čopičem ter navlažili. Po enem tednu aklimatizacije na pogoje v rastni komori smo pričeli s postopkom dehidracije. V eni kadički sta bili dve kontrolni rastlini (A in B), v drugi kadički pa dve rastlini (C in D), ki smo jih izpostavili suši in potem še rehidraciji. Rastlini C in D nismo zalivali 27 dni. Kontrolni rastlini smo redno vlažili. Med tem časom smo rastline redno kontrolirali in omogočali konstantne pogoje rasti. Po 27 dneh smo rastlini C in D vzorčili (dehidrirano stanje), nato pa jih pred pričetkom rehidracije pustili en teden v mirovanju. Proces rehidracije je potekal 48 ur z večkratnim vlaženjem po listih in okrog rastlin. Kadičko smo pokrili z najlonom tako, da se ta ni dotikal listov. Rastline smo med dehidracijo kot tudi rehidracijo stalno opazovali ter spremljali njihove morfološke spremembe.

Vzorčenje rastlin je potekalo vedno v dopoldanskem času. Vedno smo vzorčili po najmanj tri liste na vsaki rastlini in jih uporabili za določitev vsebnosti vode in za proteomske analize. Število pobranih listov je bilo odvisno od stanja rastline, vedno pa smo pobirali nepoškodovane liste iz srednjega dela rozete. Zaradi omejitve s količino materiala, smo vzorčili najmanjše potrebno število listov, razen po rehidraciji, ko smo pobrali ves preostali material. Liste, ki smo jih vzorčili za proteomsko analizo, smo dali na led prekrit z aluminijasto foljo, jih prekrili, stekali, hitro zamrzili v tekočem dušiku ter shranili pri $-76 \text{ }^\circ\text{C}$. Tako smo list ohranili minimalno spremenjen.

3.3.1.1 Določanje vsebnosti vode (VV) in relativne vsebnosti vode (RVV) v listih

Vsebnost vode (VV) nam pove odstotek vode prisotne v listu glede na celotno maso lista. Določimo ga na podlagi sveže in suhe mase listov po sledeči enačbi:

$$VV(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (...1)$$

Relativna vsebnost vode (RVV) nam pove odstotek vode v listu glede na maksimalno vsebnost vode, ki jo list lahko sprejme. Določimo jo na podlagi sveže (m_1) in suhe (m_2) mase lista ter na podlagi mase lista, ki je popolnoma nasičen z vodo (m_{nas}) po sledeči enačbi:

$$RVV(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_{nas} - m_2} \times 100 \quad (...2)$$

Po vsakem vzorčenju (kontrolne rastline, izsušene rastline, rehidrirane rastline), smo liste hitro prenesli v zaprt, stehtan, steklen tehtič. Te smo skupaj z listom ponovno stehali ter tako določili svežo maso lista (m_1). List smo nato predstavili v plastično petrijevko, obloženo z navlaženo vato in papirnatimi brisačami. Pecelj lista smo ovili z omočenim kosom vate, petrijevko pokrili ter pustili na sobni temperaturi za 24 ur, da je list prevzel vodo. Po tem smo list ponovno stehali v tehtiču in tako določili težo z vodo nasičenega lista (m_{nas}). List smo nato še izpostavili sušenju na približno 100 °C za 24 ur oz. do konstantne teže, ga ponovno stehali ter določili suho težo lista (m_2). Na osnovi pridobljenih tež smo listom določili VV in RVV.

3. 3. 2 Proteomska analiza ekstraktov listov kontrolnih/dehidriranih/rehidriranih rastlin *Ramonda nathaliae*

2-D elektroforeza omogoča ločevanje kompleksnih mešanic proteinov na podlagi izoelektrične točke v prvi dimenziji ter na podlagi molekulske mase proteinov v drugi dimenziji. V prvi dimenziji potujejo proteini po gelu glede na njihov skupni naboj do njihove izoelektrične točke, kjer imajo naboj enak nič. To metodo imenujemo izoelektrično fokusiranje. V drugi dimenziji pa se proteini s SDS-PAGE elektroforezo ločijo glede na svojo velikost (Nelson in Cox, 2000).

Pri naši raziskavi smo uporabili nadgrajeno metodo 2-D elektroforeze po O` Farrell (1975), ki vključuje uprabo komercialnih trakov z imobiliziranim pH gradientom (Görg in sod., 1999).

Proteomsko analizo listnih ekstraktov *Ramonda nathaliae* smo opravili v dveh bioloških ponovitvah. Proteom rastline smo opazovali v treh fizioloških stanjih rastlin: ko so le-te bile redno zalivane, ko so bile popolnoma izsušene ter v rehidriranem stanju, 48 ur po začetku ponovnega zalivanja. Liste smo vzorčili z rastlin, ki niso bile izpostavljene stresu (rastlini A in B) ter po izsušitvi in med rehidracijo (rastlini C in D).

3. 3. 2. 1 Priprava celičnih ekstraktov iz listov – ekstrakcija proteinov

V terilnico s pestičem, ohlajeno na – 20 °C, smo prilili tekoči dušik in vanj položili vzorec lista (stehtan in shranjen pri – 76 °C). Vzorec smo 3 minute trli, nato dolili tekoči dušik ter dodatno trli še 2 minuti. Homogenat smo s plastično žličko prenesli v terilnico na ledu, ohlajeno na 4 °C, mu dodali PVP (2,5 g PVP / 1 g suhe mase) in ekstrakcijski pufer (23 mL pufra / 1 g suhe mase) ter nato trli še dve minuti, da je nastala homogena zmes. Le-to smo prefiltrirali preko plenične predloge v epruveto na ledu, filtrat v enakih količinah razdelili po mikrocentrifugirkah ter centrifugirali (13200 obratov /min, 15 minut, 4 °C). Supernatant smo previdno odpipetirali ter ga shranili pri – 80 °C do nadaljnjih analiz. Ves postopek smo izvajali na ledu.

3. 3. 2. 2 Določanje koncentracije proteinov v ekstraktih

Uporabili smo metodo po Bradfordovi (Bradford, 1976), ki temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 na stranske skupine arginina in lizina na proteinu. V kislem mediju nastane moder kompleks, s pomočjo katerega ocenimo koncentracijo proteinov v vzorcu. Koncentracijo določimo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 595 nm.

Ekstrakte posameznih rastlin smo ustrezno redčili ter v posamezno jamico na mikrotiterski plošči nanесли 4 μL vzorca, dodali 196 μL 5-krat redčenega reagenta po Bradfordovi, premešali ter po petih minutah izmerili absorbanco na čitalcu mikrotiterskih plošč. Slepa proba je vsebovala ekstrakcijski pufer z dodanim reagentom. Koncentracijo proteinov smo določili na podlagi predhodno pripravljene umeritvene krivulje z BSA (priloga A).

3. 3. 2. 3 Čiščenje proteinskih ekstraktov

Prvi del čiščenja proteinskih ekstraktov smo opravili že med homogenizacijo, ko smo dodali PVP, ki odstranjuje fenolne snovi. Pripravljene ekstrakte smo naknadno očistili še z kompletom za čiščenje proteinskih ekstraktov (»2-D Clean Up kit«) po navodilih proizvajalca.

Glede na določene koncentracije proteinov z reagentom po Bradfordovi v ekstraktih in potrebne količine proteinov za 2-D elektroforezo, smo izračunane količine ekstraktov prenesli v mikrocentrifugirke. Posameznemu vzorcu smo dodali 3-kratni volumen precipitanta, premešali na vrtičniku in ga za 15 minut inkubirali na ledu. Nato smo mešanici vzorca in precipitanta dodali 3-kratni volumen ko-precipitanta (glede na vzorec), premešali na vrtičniku ter centrifugirali pri 8000g na 4 °C za 10 minut. Supernatant smo previdno odstranili, sedimentu pa dodali 80 μL ko-precipitanta ter inkubirali na ledu za 5 minut. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali (5 minut, 8000 g, 4 °C) in odstranili supernatant. Sedimentu smo dodali 50 μL ddH₂O, ga resuspendirali na vrtičniku in dodali 1 mL pufera za izpiranje, ki je bil predhodno hlajen pri -20 °C vsaj eno uro. Mešanici smo nato dodali še 5 μL aditiva, premešali in resuspendirali na vrtičniku. Vzorce smo nato inkubirali pri -20 °C za 30 minut ob hkratnem 20-30 sekundnim mešanjem vsakih 10 minut. Inkubaciji je sledilo centrifugiranje (10 000 g, 10 minut, 4 °C), odstranitev supernatanta ter sušenje sedimenta na zraku največ 5 minut. Očiščenim proteinom smo dodali preračunano raztopino za rehidracijo trakov, da smo na trak nanесли 150 μg proteinov. Sediment smo popolnoma raztopili z mešanjem na vrtičniku, ga centrifugirali (8000 g, 10 minut, 20 °C), supernatant pa nanесли na gel za I. dimenzijo 2-D elektroforeze.

3. 3. 2. 4 2-D elektroforeza

- **Prva dimenzija**

- Rehidracija trakov z imobiliziranim pH gradientom

Uporabili smo trakove z imobiliziranim pH gradientom (IPG trakovi) dolžine 13 cm, shranjene pri -20 °C. Najprej smo uravnali podstavek za rehidracijo v ravnotežno pozicijo in nato v reže podstavka dodali po 250 µL raztopljenega sedimenta v pufru za rehidracijo trakov z 10 mM DTT. Iz IPG traku smo odstranili plastično folijo, ki prekriva gel ter ga previdno brez tvorbe mehurčkov z gelom navzdol položili v režo. V posamezno režo smo potem odpipetirali 3 mL mineralnega olja, podstavek pokrili s pokrovom ter pustili čez noč.

- Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Po končani rehidraciji smo trakove dobro sprali z bidestilirano vodo in jih osušili na filter papirju, obrnjene z gelom navzgor. Na ploščo, ki med potekom IEF zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C, smo nanесли 4 mL mineralnega olja in čezenj postavili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, tako da je bil anodni priključek na vrhu plošče. Pri tem smo pazili, da ni prišlo do tvorbe mehurčkov. Na podstavek smo z merilnim valjem nalili 10 mL mineralnega olja in položili plastično ploščo z vdolbinami, na katere smo položili trakove obrnjene z gelom navzgor in s pozitivnim koncem na zgornjem delu plošče. Na poravnane trakove smo pravokotno položili dva elektrodna trakova, odrezana na ustrezno dolžino, ki smo ju predhodno omočili z bidestilirano vodo in nekoliko osušili na filter papirju. Čez elektrodna trakova smo namestili elektrodi ter IPG trakove prelili s približno 150 mL mineralnega olja.

Pripravljeno elektroforezno enoto smo pokrili s pokrovom ter povezali z usmernikom. Nastavili smo štiri faze izoelektričnega fokusiranja:

1. faza: doseganje 300 V, 1 min
2. faza: 300 V, 1 h
3. faza: doseganje 3500 V, 1 h 30 min
4. faza: 3500 V, 5 h (fokusiranje)

Med IEF smo lahko opazovali potovanje modrega barvila po IPG trakovih, ki se je na koncu postopka zbralo na plus koncu traku. Zaradi prehoda v bazični pH je porumenelo. Po končani elektroforezi smo odstranili elektrodi, elektrodna trakova ter IPG trakove pa shranili v plastične mape, ki smo jih hranili pri -80 °C.

• Druga dimenzija

Druga dimenzija zajema ločevanje proteinov v poliakrilamidnem ločilnem gelu glede na molekulsko maso proteinov. Sestavljena je iz več korakov.

- Vlivanje gelov

Pripravili smo gele z debelino 1 mm. 19 mL ločilnega gela z ustrezno koncentracijo akrilamida smo vlili v elektroforezni kolup, sestavljen iz dveh steklenih plošč, pritrjenih na nosilec. Na zgornjo površino gela smo z mikropipeto počasi dolili tanko plast bidestilirane vode, ki gelu omogoča enakomerno polimerizacijo. Gel smo pustili čez noč, da je polimeriziral. Naslednji dan smo gelu pred uporabo odlili bidestilirano vodo ter ga dobro osušili.

- Uravnoteženje trakov in prenos trakov na ločilni gel

Uravnoteženje IPG trakov poteka v pufru za uravnoteženje I in II, ki smo ju pripravili sveže. Odtaljene IPG trakove smo sprva spirali v štirih epruvetah 1-kratnega SDS pufru. Te smo nato prestavili v epruvete z 10 mL pufru za uravnoteženje I ter jih za 15 minut postavili na stresalnik. Trakove smo iz pufru za uravnoteženje I hitro prestavili v epruvete s pufrom za uravnoteženje II ter jih zopet za 15 minut postavili na stresalnik. Po stresanju smo jih prestavili na filter papir z gelom navzgor ter jih osušili. Na površino ločilnega gela smo nalili na 100 °C segreto 0,5 % agarozno raztopino, skozi katero smo takoj, brez tvorbe mehurčkov spustili trak ter ga s pomočjo igle potisnili na površino gela.

- 2-D elektroforeza

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo na kolup postavili zgornjo elektroforezno posodo, odstranili stojalo ter kolup prestavili v spodnjo elektroforezno posodo z 1 x SDS pufrom. V zgornjo elektroforezno posodo smo prav tako dolili 1 x SDS pufer ter jo pokrili s pokrovom in povezali na usmernik. Med elektroforezo smo vzdrževali stalno temperaturo (15 °C) s pomočjo hladilnega sistema. Potovanje vzorcev je potekalo v smeri anode najprej 15 minut pri konstantnem toku 20 mA/gel in nato še pri konstantnem toku 40 mA/gel za približno 1 h 30 min oziroma dokler barvilo bromfenol modro ni doseglo spodnjega roba gela. Po končanem potovanju smo ustavili usmernik, odstranili vse elektroforezne dele, gel ustrezno označili ter pričeli z barvanjem za detekcijo proteinov.

3. 3. 2. 5 Detekcija proteinov na gelu

Gel smo po končani elektroforezi prestavili v posodo z barvilom Oriol Blue ter postavili na stresalnik za 90 minut (250 mL barvila/2 gela). Nato smo barvilo odlili in gele spirali z bidestilirano vodo 3-krat po 5 minut na stresalniku. Ves čas smo delali v temi ter posode dodatno zaščitili z aluminijasto foljo. Gele smo pustili 30 minut v vodi in jih nato slikali.

3. 3. 2. 6 Slikanje gelov in računalniška obdelava slik

2-D gele smo slikali s sistemom za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR – Gbox kamera. Slike smo obdelali s pomočjo računalniškega programa 2-D Dymension (Syngene), ki omogoča primerjavo več slik gelov med seboj. Referenčni gel je bil kontrolni gel (vzorec pripravljen iz listov hidrirane rastline), s katerim smo primerjali ostale gele (listi dehidrirane in rehidrirane rastline). Za posamezni vzorec smo v analizo vzeli dva gela, ki sta predstavljala biološko ponovitev med vzorci. S pomočjo programa smo določili točno lego 2-D elektroforetskih lis in jih kvantitativno ovrednotili na podlagi normaliziranega volumna. Slednji predstavlja razmerje med volumnom ene lise glede na celokupen volumen vseh lis na gelu. Proteine smo upoštevali kot diferencialno izražene, če je bilo razmerje med normaliziranimi volumni glede na kontrolni gel večje od 1,5 ($R > 2$) in statistično značilno ($p < 0,05$). Statistična značilnost diferencialnega izražanja je bila preverjena s t-testom, saj smo v računalniško obdelavo vključili po 2 gela vsake biološke ponovitve.

3. 3. 3 Analiza fenolov v izvlečkih liofiliziranih listov hidrirane in dehidrirane rastline *Ramonda nathaliae*

Fenolne spojine so lahko prisotne v topni, kot tudi v netopni obliki, kjer so vezane na komponente celične stene (Naczki in Shahidi, 2004). Večina analitskih metod topnih in netopnih oblik polifenolov temelji na ekstrakciji z vodnimi oziroma organskimi topili, kateri sledi izpostavitvev bazični (Krayger in sod. 1982) in kisli hidrolizi s katero pridobijo tudi netopne fenolne spojine, ki so vezane na komponente celične stene (Arranz in Calixto, 2010). Fenolni profil smo določili v rastlinskih izvlečkih svežih (hidriranih) in suhih liofiliziranih listov ekstrahiranih v topilu sestavljenemu iz 50 % etanola, 2 % očetne kisline in 48 % vode. Hkrati smo izvlečke v raztopini kot tudi njihove suhe preostanke izpostavili kisli hidrolizi ter s tem preverili fenolni profil topnih (prostih in vezanih) ter netopnih fenolov.

3.3.3.1 Priprava izvlečkov liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline *R. nathaliae* za LC-UV analizo

Liofilizirane liste hidrirane in izsušene rastline (prib. 150 mg posameznih listov) smo ločeno homogenizirali s tekočim dušikom, kot pri pripravi izvlečkov za *in vivo* ter *in vitro* raziskave. Posamezne homogenate smo razdelili v dve stehani mikrocentrifugirki ter jim dodali 20-kratni volumen raztopine topila iz 50 % etanola, 2 % očetne kisline in 48 % vode ter jih 1 uro ekstrahirali na sobni temperaturi. Izvlečke smo nato centrifugirali, polovico bistre raztopine smo shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, drugo polovico raztopine pa smo prenesli v stekleno vialo ter dodali koncentrirano žveplovo(VI) kislino (H_2SO_4), da smo dobili 10 % kislino v topilu. Vialo smo nato inkubirali 20 h pri $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, po inkubaciji ohladili, centrifugirali ter shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

Oborinam, ki so ostale po ekstrakciji s topilom smo dodali 20-kratni volumen metanola, premešali, centrifugirali in odstranili supernatant. S preostalima oborinama smo izvedli kislno hidrolizo po metodi povzeti po Arranz in Calixto (2010).

Kisla hidroliza: Oborini smo dodali 20-kratni volumen 10 % H_2SO_4 v metanolu. Raztopino smo prenesli v stekleno vialo ter inkubirali 20 h pri 85 °C. Po inkubaciji smo vialo previdno odprli, prenesli v mikrocentrifugirko, centrifugirali ter raztopino shranili do analize na – 80 °C (Hartzfeld in sod., 2002).

Pred LC-UV analizo smo vse izvlečke filtrirali skozi 0,20 μm filter.

3.3.3.2 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

Ekstrakcijo smo izvedli z uporabo kolone Strata-X. Kolono smo aktivirali z 2mL metanola, aktivacijsko topilo pa odstranili in uravnotežili z 2mL vode. Sledil je nanos vzorca (200 μL izvleček + 1000 μL vode). Nezaželenne komponente smo iz kolone odstranili s spiranjem z 2 mL raztopine 15 % metanola, čemur je sledilo sušenje polnila z vakuumom (3 minute).

3.3.3.3 Analiza fenolnih spojin z LC-UV

Separacija fenolnih spojin je potekala na reverznofazni koloni z gradientom dveh mobilnih faz, mobilne faze A (1 % (w/v) raztopina metanojske kisline) in mobilne faze B (acetonitril).

Preglednica 16: Gradient mobilne faze A (1 % raztopina metanojske kisline); B acetonitril

čas (min)	mobilna faza A (%)
0 - 2	90
2 - 18	90 - 40
18 - 18,2	40 - 20
18,2 - 20	20
20 - 20,2	20 - 90
20,2 - 26	90

Pogoji kromatografske ločbe:

- temperatura kolone 25 °C
- volumen iniciranja 10 μL
- pretok 0,350 mL/min

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

3. 3. 4 Antioksidativno delovanje različno pripravljenih listnih izvlečkov rastline *Ramonda nathaliae*

3. 3. 4. 1. Priprava rastlinskih izvlečkov iz liofiliziranih listov hidrirane in dehidrirane (izsušene) rastline *Ramonda nathaliae*

Izvlečke listov hidrirane in listov izsušene rastline smo pripravili v različno polarnih topilih; v 96 % etanolu, v 50 % etanolu, v 50 % etanolu z dodano 2 % očetno kislino, v 100 % acetonu, v 50 % acetonu, v 50 % acetonu z dodano 2 % očetno kislino (preostanek volumenskega deleža posameznih topil je voda) ter v pufru PBS (vodno topilo). Liste smo posamezno stehali, jih prestavili v terilnico, hitro prelili s tekočim dušikom ter homogenizirali do drobnega prahu. Homogenat smo razdelili na tri alikvote in jih s spatulo prenesli v plastične, stehane falkonke. Glede na dodano maso smo prilili 20-kratni volumen topila ter jih ob neprestanem stresanju ekstrahirali 30 minut na sobni temperaturi. Po končani ekstrakciji smo izvlečke centrifugirali za 5 minut pri 3900 obratov/min, raztopino razdelili v posamezne mikrocentrifugirke in jih shranili na – 80 °C do nadaljnjih analiz.

3. 3. 4. 2 *In vitro* določanje celokupne vsebnosti fenolnih spojin v izvlečkih, pripravljenih z različnimi topili - metoda po Folinu

Pripravljenim izvlečkom smo določili vsebnost fenolov z modificirano metodo po Folinu, povzeto po Singleton in Rossi (1965). Ekstrakte smo sprva ustrezno redčili na podlagi preliminarne poskusov. 20 µL razredčenega vzorca smo odpiptevali v mikrocentrifugirko ter dopolnili z bidestilirano vodo do 750 µL. Temu smo dodali 125 µL razredčenega Folin – Ciocalteuovega reagenta (reagent:voda=1:2), premešali in pustili 5 minut. V mešanico smo nato dodali 125 µL 20 % Na₂CO₃, premešali ter pustili 90 minut. Slep vzorec je bila raztopina iz 750 µL bidestilirane vode, 125 µL reagenta in 125 µL 20 % (w/v) raztopine Na₂CO₃. Po razvitju barve smo vzorcem pomerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm na mikrotiterski plošči. Iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z galno kislino (priloga B), smo določili koncentracijo antioksidantov v izvlečkih ter njihovo vsebnost izrazili kot masni delež galne kisline (masni ekvivalent) v suhi snovi (w/w).

3. 3. 4. 3 *In vivo* določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov *Ramonda nathaliae*, pripravljenih z različnimi topili

Antioksidativno delovanje izvlečkov sveže (hidrirane) in izsušene rastline, pripravljenih v različnih topilih, smo preverjali na modelnem organizmu kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM2155) v stacionarni fazi rasti. Vse meritve smo izvedli v dveh bioloških ponovitvah. Rast je potekala pod kontroliranimi pogoji, ob vsakem tretiranju kvasovk z rastlinskimi izvlečki pa smo vzporedno izvajali kontrolne meritve, kjer smo kvasnim celicam dodali topilo posameznega izvlečka ali pa smo jih tretirali brez dodanega izvlečka oz. topila.

- **Priprava kulture kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti**

- Kultivacija kvasovk

Tri dni staro kulturo *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM2155) smo iz trdnega gojišča YEPD prenesli v 50 mL tekočega gojišča YEPD. Uporabili smo erlenmajerice z enim utorom ter roko, ki služi merjenju absorbance pri valovni dolžini 650 nm. Prenesli smo toliko celic, da smo dosegli optično gostoto suspenzije približno 0,95. Nato smo 40 mL suspenzije prenesli v erlenmajerico z enim utorom in stransko roko, ki je vsebovala 360 mL tekočega YEPD gojišča. Nato smo ponovno pomerili absorbenco (OD približno 0,18) ter pripravljeno suspenzijo za 60 h inkubirali na stresalniku pri 220 obratih/min na 28 °C do stacionarne faze rasti.

- Prenos kulture v PBS

50 mL kvasne brozge smo prelili v falkonko, jo centrifugirali (4000 obratov/min, 3 min) ter odlili supernatant. Sediment smo resuspendirali v 50 mL PBS pufra, ogretega na 28 °C ter zopet centrifugirali pri istih pogojih. Sedimentu smo z merilnim valjem prilili 50 mL na 28 °C ogretega pufra PBS ter ga resuspendirali. Nato smo 40 mL suspenzije prenesli v 500 mL erlenmajerico z enim utorom in stransko roko ter dodali 160 mL ogretega pufra PBS na 28 °C. Preneseno kulturo smo inkubirali na stresalniku pri 220 obratih/min na 28 °C za 96 ur. V pripravljeni suspenziji je bilo približno 1×10^8 celic/mL.

- **Tretitanje kvasovk z izvlečki liofiliziranih listov dehidrirane (izsušene) in hidrirane (sveže) rastline *Ramonda nathaliae***

Kvasovke smo tretirali s tremi izbranimi izvlečki, pripravljenimi v naslednjih topilih: 50 % etanol z dodano 2 % očetno kislino, 96 % etanol (preostanek volumskega deleža je voda) in pufer PBS (vodni izvleček).

Po 96 h inkubacije v PBS pufru smo po 10 mL celične suspenzije prestavili v 50 mL falkonke. Suspenziji smo dodali ustrezen volumen ekstrakta ter celice za dve uri tretitali na stresalniku pri 220 obratih/min in 28 °C. Kontrolni vzorec celične suspenzije, ki smo ga uporabljali pri vsaki meritvi, ni bil izpostavljen izvlečkom. Po dveh urah smo preverjali antioksidativno delovanje rastlinskih izvlečkov na podlagi merjenja znotrajcelične oksidacije, celične energijske metabolne aktivnosti in lipidne peroksidacije celic. Meritve smo izvedli v dveh bioloških ponovitvah.

- **Določanje znotrajcelične oksidacije**

Znotrajcelično oksidacijo smo določali po metodi, ki smo jo povzeli po Jakubowski in sod., (1999). Metoda temelji na merjenju fluorescence oksidiranega barvila 2',7'-diklorofluoresceina. Celicam ga dodamo kot ester, ki lahko zaradi nepolarnosti prehaja preko membran v celice. Znotraj celic ga esterase deacetilirajo do 2',7'-diklorodihidrofluorescina (H_2DCF), ki je polarna oblika reagenta, ki ne more prehajati nazaj preko membran. V celici postane tarča ROS, ki ga oksidirajo. Reagent v tej obliki fluorescira in predstavlja indikator znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997).

V mikrocentrifugirko smo prenesli po 2 mL z izvlečki tretirane suspenzije celic, jo centrifugirali (5 minut, 14000 obr./min) ter odstranili supernatant. Sedimentu smo dodali 2 mL filtriranega 50 mM kalij-fosfatnega pufru (pH = 7,8), sediment resuspendirali na vrtičniku ter ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Spiranje celic smo trikrat ponovili. Po tretjem spiranju in centrifugiranju smo odstranili ves supernatant ter sedimentu dodali 990 μ L kalij-fosfatnega pufru. Sediment smo dobro resuspendirali na vrtičniku ter inkubirali 5 minut na 28 °C. Po končani inkubaciji smo vzorcem v temi dodali 10 μ L sveže pripravljenega 1 mM H_2DCFDA v 96 % etanolu. Vzorce smo takoj zavili v aluminijasto folijo ter za 15 minut inkubirali na stresalniku pri 28 °C. Po inkubaciji smo dvakrat po 200 μ L posameznega vzorca v petih minutah nanesti na mikrotitersko ploščo. Kinetiko fluoresciranja vzorcev smo merili na čitalcu mikrotiterskih plošč pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 288 nm in emisijski svetlobi valovne dolžine 520 nm. Rezultate tretiranih celic smo predstavili kot relativno fluorescenčno intenziteto (RFI) določeno na podlagi izmerjenih fluorescenc z izvlečki tretiranih suspenzij glede na izmerjeno fluorescenco kontrolne, netretirane suspenzije.

- **Določanje celične energijske metabolne aktivnosti**

Vzporedno z meritvami znotrajcelične oksidacije smo določali celično energijsko metabolno aktivnost z uporabo kompleta »BacTiter-GloTM Microbial Cell Viability Assay«, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca. Metoda je občutljiva in temelji na luciferin-luciferazni reakciji, kjer količina ATP sovпада z intenziteto oddane luminiscence (Promega). Količina ATP nam kot učinkovit biomarker za določanje celične metabolne aktivnosti, poda potrebne informacije o celičnem odzivu na delovanje izvlečkov.

Komplet sestavljata pufer in substrat v ločenih stekleničkah, shranjena na –20 °C. Reagente smo odtalili in pufer v temi prelili v stekleničko s substratom. Nato smo v jamico mikrotiterske plošče za merjenje luminiscence prenesli po 100 μ L 10-krat redčene tretirane celične suspenzije. V jamice smo nato dodali po 100 μ L reagenta, ploščico vstavili v merilec mikrotiterskih plošč, premešali ter po 5 minutah pomerili luminiscenco vzorcev.

- **Določanje lipidne peroksidacije**

Oksidativne poškodbe lipidov smo določili z modificirano metodo za določanje lipidne peroksidacije celic z uporabo TBA (tetra-butilamin), ki smo jo povzeli po Ortega-Villasante in sod. (2005). Metoda temelji na merjenju absorbance rdečega kompleksa, ki nastane pri vezavi TBA z malondialdehidi, ki nastanejo ob razpadu prisotnih lipidnih hidroperoksidov v kislem mediju. Absorbanco kompleksa merimo pri valovni dolžini 532 nm. Pomanjkljivost metode je nezadostna specifičnost, saj lahko malodialdehidi reagirajo tudi z drugimi komponentami (razgradnimi produkti sladkorjev, aminokislinami, proteini, nukleinskimi kislinami in drugimi aldehidi) (Janero, 1990; Laguerre in sod., 2007).

Za določanje lipidne peroksidacije celic smo 10 mL kvasne suspenzije dve uri tretirali z rastlinskimi izvlečki pripravljenimi s 50 % etanolom z dodano 2 % ocatno kislino (preostanek volumskega deleža je voda). Poskus smo izvajali z dvema kontrolama. V eno izmed njiju smo po dveh urah dodali menadion, ki je znan induktor oksidativnega stresa. Po tretiranju celic z rastlinskimi izvlečki smo vzorce 2-krat sprali s PBS pufrom ogretim na 28

°C, nato pa vsem vzorcem in eni kontroli dodali 200 µL 1 M raztopine menadiona (koncentracija v suspenziji je bila 20 mM) ter inkubirali na stresalniku pri 220 obratov/min na 28 °C za dve uri. Vzorce smo nato 2-krat spirali z natrij-kalijevim fosfatnim pufrom, sediment resuspendirali v 500 µL reagenta za lipidno peroksidacijo in prestavili v vialo s pokrovčki. Vzorcem smo dodali cirkonij-kremenčeve kroglice, jih 5-krat po 1 minuto stresali na električnem mešalu ter inkubirali za 30 minut na 90 °C v termobloku s stresanjem pri 600 obratih/min. Po inkubaciji smo vzorce ohladili na ledu, centrifugirali (10 minut, 14 000 obratov/min) in 500 µL supernatanta prestavili v nove mikrocentrifugirke. Supernatantu smo dodali 500 µL butanola, premešali na električnem mešalniku ter pustili na sobni temperaturi za 30 minut. Vzorce smo nato 5 minut centrifugirali pri 14000 obratov/min, supernatantu pa pomerili absorbanco pri valovni dolžini 532 nm.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Ramonde spadajo v majhen odstotek višjih rastlin, ki so zmožne preživetja daljših sušnih obdobj (Stevanović in sod., 1991). Zaradi sposobnosti preživetja popolnoma izsušenega stanja ter oživitve ob ponovnem stiku z vodo, so potencialni vir rastlinskih bioaktivnih učinkovin. S spletom metabolnih, antioksidativnih in drugih prilagoditvenih mehanizmov, ki niso še v celoti pojasnjeni, se lahko rastline sposobne oživitve uspešno ubranijo pred sušnim stresom. V okviru diplomske naloge smo se posvetili proteomski analizi in raziskovanju učinka bioaktivnih učinkovin, predvsem fenolov, rastline *Ramonda nathaliae* v posameznih obdobjih dehidracijsko-rehidracijskega cikla. Morebitno učinkovitost izvlečkov iz listov zalivanih rastlin in listov izsušenih rastlin smo skušali ovrednotiti *in vitro* ter *in vivo*.

Poglaviten namen proteomske analize je bil ugotoviti ali pri *Ramonda nathaliae* izsušitev povzroči podobno spremembo v proteinskem profilu kot smo jo v našem laboratoriju že določili za *Ramonda serbica* (Franko 2010). Pozitiven odgovor bi tako pomenil potrditev predhodnih rezultatov, kot indikacijo, da gre za odziv značilen za celoten rod *Ramonda*.

Na osnovi že objavljenih študij (Jovanović in sod., 2011) smo tudi sklepali, da je *R. nathaliae*, zlasti ko je izsušena, vir učinkovin, ki lahko delujejo antioksidativno. Le-te so, kot endogene učinkovine, vsekakor pomembne za njen edinstven odziv na sušo, možno pa je, da bi te spojine lahko zaščitile pred različnimi stresi tudi druge organizme.

4. 1 GOJENJE IN VZORČENJE RASTLINE *Ramonda nathaliae*

Za proteomsko analizo listnih ekstraktov izsušene oz. rehidrirane *R. nathaliae* smo rastline vzgajali pri kontroliranih pogojih v rastni komori. Na sliki 4:1 sta prikazani dve kontrolni rastlini. Slike 4: 2-6 kažejo dve rastlini, ki smo jih najprej izpostavili suši do izsušitve listov (4: 2-4) potem pa ponovno ovlažili (4: 5 in 6).



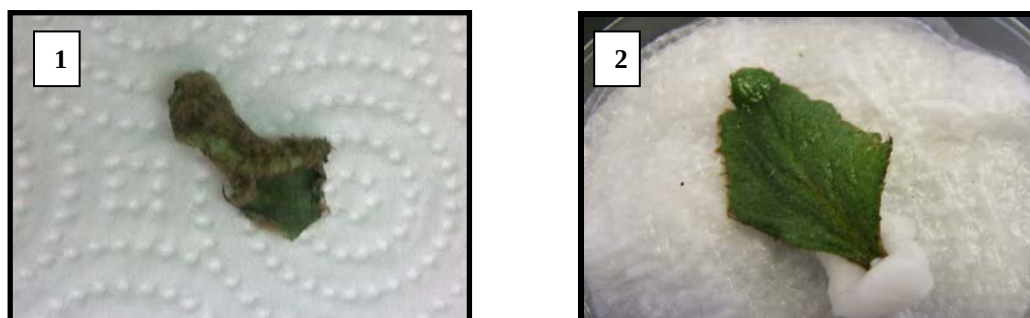
Slika 4: Izpostavljanje rastline *Ramonda nathaliae* izsušitvi in rehidraciji. 1: Kontrolni, redno zalivani rastlini A in B; 2: Rastlini C in D 5 dni po prenehanju zalivanja; 3: Rastlini C in D 14 dni po prenehanju zalivanja; 4: Rastlini C in D 28 dni po prenehanju zalivanja; v tej fazi smo vzorčili liste z obeh rastlin. Vzorce smo označili s C-D in D-D (rastlina C oz. rastlina D v fazi. izsušitve); 5: Rastlini C in D 24 ur po začetku ponovnega vlaženja; 6: Rastlini C in D 48 ur po začetku ponovnega vlaženja; v tej fazi smo vzorčili liste z obeh rastlin. Vzorce smo označili s C-R in D-R (rastlina C oz. rastlina D v fazi rehidracije).

Dve kontrolni rastlini smo vzorčili v hidriranem stanju (rastlina A in rastlina B), ostali dve rastlini (C in D) pa smo vzorčili v izsušenem stanju (vzorec C-D in vzorec D-D) ter 48 ur po začetku ponovnega vlaženja (rastlina C-R in rastlina D-R). Rastlini C in D smo pripeljali do stanja izsušitve tako, da jih 28 dni nismo zalivali. Med procesom izsuševanja smo stalno spremljali morfološke spremembe rastlin ter jim z nadziranjem temperature in vlage v rastni komori omogočili čimbolj konstantne pogoje.

Pri rastlinah C in D je cikel dehidracije, ocenjeno na podlagi njihovih morfoloških sprememb, potekal po pričakovanjih. Sprva kompaktni in čvrsti listi so že peti dan po prenehanju zalivanja postali nekoliko uveli (slika 4; 2), po 14 dneh pa so se predvsem mlajši listi v srednjem in notranjem delu rozete pričeli zvijati in kazati značilno obliko stanja izsušitve (Slika 4; 3). Tekom naslednjih faz dehidracije so se nepoškodovani listi značilno (Mužerlin, 2009) zvili v obliko tulca, poškodovani, stari listi pa ne. Po 28 dneh brez zalivanja so rastline bile posušene; nepoškodovani listi so bili popolnoma zviti in trdi na otip (Slika 4; 4). Ohranili so tudi karakteristično zeleno barvo, kar je pričalo o ohranitvi klorofila. *R. nathaliae* je namreč, tako kot *R. serbica*, homoiochlorofilna rastlina (Dražić in sod., 1998). V tej fazi smo izsušene rastline C in D vzorčili, pri tem pa pazili, da smo pobrali značilno zvite, zdrave liste (Slika 5; 1). Po vzorčenju smo rastline za en teden pustili v mirovanju, da so se stabilizirale, saj smo jih z odvzemom listov izpostavili mehanskemu stresu. Nato smo pričeli z rednim vlaženjem rastlin po listih ter po okoliškem mahu. Proces rehidracije je z morfološkega vidika potekal po pričakovanjih, saj so se listi že po nekaj urah pričeli razvijati (Slika 4; 5, 6). Rehidracija je potekala 48 ur nato smo rastline ponovno vzorčili. Rastline smo vedno vzorčili v dopoldanskem času. Vse vzorčene liste smo stehali ter tiste, ki smo jih namenili proteomski analizi, do nadaljnje uporabe shranili pri -76°C . Pri vsakem vzorčenju smo določili relativno vsebnost vode (RVV) in vsebnost vode (VV) v listih.

- Določanje vsebnosti vode (VV) in relativne vsebnost vode (RVV) v listih

Slika 5 prikazuje del postopka določanja RVV v stanju izsušitve, ko smo rastlinam odvzeli list z značilno morfološko obliko za to fazo ter z ohranjeno zeleno barvo (slika 5; 1). Po 24 urah vlaženja se je isti list razvil in povrnil izgled pred izsušitvijo (slika 5; 2).



Slika 5: Del postopka določanja RVV listov izsušenih rastlin. 1: List rastline C vzorčen 28 dni po prenehanju zalivanja. 2: Isti list po 24 urni inkubaciji v navlaženi petrijevi posodi

Lista posameznih rastlin smo takoj stehali (m_1), ju nato položili v petrijevo posodo z omočeno vato ter jima po 24 urah določili maso z vodo nasičenih listov (m_{nas}). V tem času sta se lista razvila in povrnila v prvotno stanje pred dehidracijo. Nato smo jima določili še suho maso (m_2) po 24 urni izpostavitvi na 100°C . Vse pridobljene mase listov smo uporabili za določanje VV in RVV v posameznih fazah dehidracije/rehidracije (preglednica 17).

Vse pridobljene mase listov smo uporabili za določanje VV in RVV v posameznih fazah dehidracije/rehidracije (preglednica 17). Te dve vrednosti so nam podale informacijo o

vodnem stanju v listih rastlin v posameznih fazah poskusa in sta tudi pomembni pokazateljici sposobnosti uravnavanja vode poikilohidričnih rastlin, pri katerih se vsebnost vode sklada z vsebnostjo vlage v okolici (Stevanović in Janković, 2001).

Preglednica 17: Vsebnosti vode (VV) in relativne vsebnosti vode (RVV) v hidriranih (kontroli), izsušenih in rehidriranih listih *Ramonda nathaliae*. Vrednosti so izračunane na podlagi mase sveže teže lista (m_1), mase suhe teže lista (m_2) in mase lista nasičene z vodo (m_{nas}).

Vzorec	Fiziološko stanje listov	Morfološki opis listov	m_1 (g)	m_2 (g)	m_{nas} (g)	VV (%)	RVV (%)
Rastlina A (kontrola 1)	Normalno hidrirani	Nepoškodovani listi iz srednjega dela rozete	0,3734	0,0737	0,3873	80,26	95,57
Rastlina B (kontrola 2)	Normalno hidrirani	Nepoškodovani listi iz srednjega dela rozete	0,4316	0,0745	0,4223	82,74	102,67
Rastlina C: stanje C-D; (izsušitev)	Izsušeni	Suh, trd list, zviti v tulec	0,0735	0,0585	0,3369	20,41	5,39
Rastlina D: stanje D-D; (izsušitev)	Izsušeni	Suh, trd list, zviti v tulec	0,0915	0,0755	0,7219	17,49	2,48
Rastlina C: stanje C-R; (rehidracija)	Rehidrirani	Rehidriran list iz srednjega dela rozete, malo obrezan posušeni del roba	0,02496	0,0635	0,2685	74,56	90,78
Rastlina D: stanje D-R; (rehidracija)	Rehidrirani	Rehidriran list iz srednjega dela rozete, malo obrezan posušeni del roba	0,2421	0,0579	0,2443	76,08	98,82

RVV in VV v listih kontrolnih rastlin sta pokazali, da sta rastlini A in B bili ustrezno vlažni, med njima pa ni bilo večjih razlik. Vrednost za RVV, ki je večja od 100% (preglednica 17) lahko pripišemo eksperimentalni napaki. RVV listov izsušenih rastlin C in D so bile približno 5 %, kar je primerljivo z ostalimi študijami pri ramondah (Dražić in sod., 1998; Sgherri in sod., 2004; Veljović-Jovanović in sod., 2006; Jovanović in sod., 2011; Franko, 2010). Vendar je VV, določena za iste liste, precej visoka (približno 20 %) v primerjavi s študijami sorodne rastline *R. serbica*, pri kateri je VV bila približno 7 % (Mužerlin, 2009; Franko, 2010). Seveda gre za različni, čeprav sorodni rastlini in lahko da je fiziološki odziv *R. nathaliae* drugačen kot *R. serbica*. Ne moremo pa izključiti eventualnih razlik v rastnih pogojih ali pa eksperimentalnih napak.

4. 2 PROTEOMSKA ANALIZA EKSTRAKTOV LISTOV KONTROLNE/DEHIDRIRANE/REHIDRIRANE RASTLINE *Ramonda nathaliae* Z 2-D ELEKTROFOREZO

- Določanje koncentracije proteinov v celičnih ekstraktih listov

Med homogenizacijo rastlinskega materiala smo dodali PVP in tako odstranili fenolne snovi (Veljović-Jovanović in sod., 2002), ki bi lahko motile separacijo proteinov z 2-D elektroforezo. Pripravljene ekstrakte smo nato očistili še s kompletom za čiščenje proteinskih ekstraktov, ki temelji na obarjanju proteinov in odstranjevanju motečih snovi, kot so detergenti, soli, lipidi, fenoli in nukleinske kisline. Za dobro ločenost proteinskih lis z 2-D elektroforezo je, poleg ustrezne priprave ekstraktov in čiščenja ekstrahiranih proteinov, pomembno tudi koliko le-teh bomo na gel nanesli. Na osnovi predhodnih raziskav (Franko, 2010) smo se odločili, da bomo na gel nanašali po 150 µg očiščenih proteinov. Najprej smo določili koncentracijo proteinov v celičnih ekstraktih listov z metodo po Bradfordovi (preglednica 18). Ustrezen volumen celičnih ekstraktov listov smo nato uporabili za nadaljnje čiščenje ekstrahiranih proteinov (preglednica 18). Posamezen očiščeni vzorec je vseboval najmanj 150 µg proteinov v 250 µL raztopine, potreben za nanos na gel.

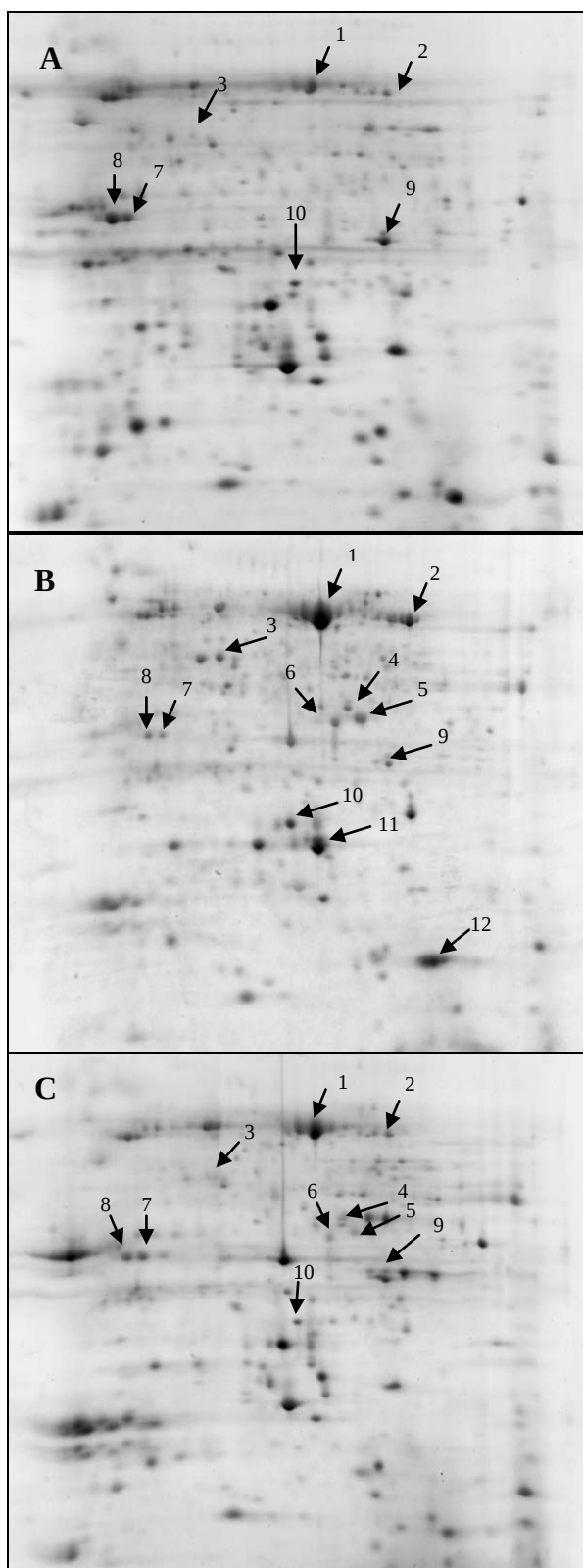
Preglednica 18: Koncentracija proteinov v neočiščenih ekstraktih kontrolnih listov (rastlina A, rastlina B), izsušenih listov (vzorec C-D, vzorec D-D) in rehidriranih listov (vzorec C-R, vzorec D-R) rastline C oz. D ter izračunani volumni ekstraktov uporabljenih za nadaljnjo proteomsko analizo

Vzorec	Koncentracija neočiščenih proteinov v celičnih ekstraktih listov (g/L)	Volumen neočiščenih celičnih ekstraktov listov uporabljen za proteomsko analizo (µL)
Rastlina A	1,56	150
Rastlina B	0,84	200
Rastlina C: stanje C-D	2,50	100
Rastlina D: stanje D-D	1,12	150
Rastlina C: stanje C-R	1,35	150
Rastlina D: stanje D-R	1,07	150

- 2-D elektroforeza

Z 2-D elektroforezo smo določili profil proteinov v listih *R. nathaliae* v hidriranem, izsušenem in rehidriranem stanju rastline. Proteinske profile vzorcev rastlin v izsušenem in rehidriranem stanju smo primerjali s profilom kontrolnih vzorcev v hidriranem stanju rastlin s pomočjo uporabe računalniškega programa 2-D Dymension. Za vsako stanje rastline smo pripravili po dve biološki ponovitvi.

Slika 6 prikazuje reprezentativne 2-D gele kontrolne (hidrirane) rastline (slika 6: A) in izsušene (slika 6: B) ter rehidrirane (slika 6: C) rastline.



Slika 6: Reprezentativni proteinski profili ekstraktov listov: (A) kontrolnih (hidriranih), (B) izsušenih in (C) rehidriranih rastlin *R. nathaliae*. S puščicami so označeni diferencialno izraženi (inducirani in represirani) proteini

Označene proteine smo kvantitativno ovrednotili s programom 2-D Dymension. Za posamezni vzorec smo v analizo vzeli dva gela, ki sta predstavljala biološko ponovitev posameznih vzorcev. S pomočjo programa smo določili točno lego 2-D elektroforetskih lis in jih kvantitativno ovrednotili na podlagi normaliziranega volumna (preglednica 19).

Preglednica 19: Prikaz sprememb v izražanju proteinov pri vzorcih listov *R. nathaliae* v fazi izsušitve in rehidracije glede na izražanje proteinov v vzorcih kontrolnih (hidriranih) listov

Št. 2-D lise	Izsušitev		Rehidracija	
	R ^a	p ^b	R ^a	p ^b
1	+1,524	0,020	+1,28	0,191
2	+4,755	0,023	+1,17	0,692
3	+1,989	0,038	-1,411	0,375
7	-2,785	0,004	+1,139	0,820
8	-3,165	0,006	-1,22	0,535
9	-2,632	0,006	-1,379	0,079
10	+3,145	0,062	-1,408	0,370

^aR – zvišanje (+) oz. znižanje (-) razmerja vrednosti normaliziranih volumnov (razmerje med volumnom ene lise in celokupnim volumnom vseh lis na gelu) vzorcev izsušenih in rehidriranih listov glede na vzorce kontrolnih listov, izračunano s programom 2-D Dymension

^bp – Student t-test je bil izveden za preverjanje statistične značilnosti diferencialnega izražanja proteina glede na kontrolo

Največjo spremembo proteinskega profila glede na kontrolni profil hidriranih listov smo opazili v fazi izsušitve, predvsem v smislu povečanega izražanja in *de novo* sinteze mnogih proteinov. Proteinski profil listov rehidrirane rastline pa je podoben profilu listov kontrolne (hidrirane) rastline (slika 6). Tako so na gelu, s katerim smo ločili proteine ekstrahirane iz lista rastline v fazi izsušitve bolj intenzivne lise 1, 2, 3 in 10 (slika 6: B, preglednica 19). Razmerje vrednosti normaliziranih volumnov za te lise je v fazi izsušitve povišano v odnosu na kontrolo, v fazi rehidracije pa se ponovno zmanjša, vendar ne na enak način pri vsaki lisi. Spreminjanje ravni proteinov kažejo na izražanje različnih mehanizmov v fazi izsušitve in rehidracije. Na podlagi dosedanjih študij proteinov pri rastlinah sposobnih oživitve lahko predpostavimo, da se je kot odziv na sušni stres povečala sinteza nekaterih proteinov, kot na primer LEA proteinov in dehidrinov. Ti se pri rastlinah kontinuirano sintetizirajo, vendar se ob izpostavljenosti stresu njihova sinteza poveča, saj imajo večstransko zaščitno vlogo v celicah (Roberts in sod., 1993; Rohrig in sod., 2006). Poleg tega so Jovanović in sod. (2011) pri *R. nathaliae* dokazali, da so dehidrini prisotni že v hidriranih listih, kot tudi v pozni fazi dehidracije, kjer bi bili lahko zadolženi za upočasnitev izsuševanja ali imeli direktno vlogo pri zaščiti proteinov (Hara in sod., 2004).

Na proteinskem profilu v fazi dehidracije smo opazili tudi *de novo* sintezo proteinov, primer so lise 4, 5, 6, 11 in 12 (Slika 6: B). Lise na novo induciranih proteinov se v rehidracijski fazi ohranijo, vendar so manj izrazite. Novo sintetizirani proteini so lahko tudi predstavniki LEA proteinov. Rastlina tolerantna na izsušitev *X. humilis* je tekom dehidracije aktivirala 16 LEA genov, katerih proteini imajo različno vlogo pri zaščiti membran, celičnih struktur in drugih proteinov (Rohrig in sod., 2006). Tekom začetne faze rehidracije je rastlina najbolj izpostavljena stresu, saj se celice osredotočijo predvsem na biosintezo, kar povzroči večjo produkcijo ROS (Veljović-Jovanović in sod., 2006). Da bi bolje razumeli potek rehidracijskega cikla na proteinski ravni, bi bila potrebna natančnejša analiza posameznih rehidracijskih faz s spremljanjem proteinskih profilov in opazovanjem ravni določenih proteinov tekom posameznih faz rehidracije.

Na proteinskem profilu v fazi izsušitve je vidna znižana raven 2-D lis 7, 8 in 9 v primerjavi s kontrolo (slika 6: B), kar si lahko razlagamo kot posledico razgradnje proteinov tekom dehidracije. Ta je verjetno najbolj izrazita v srednjem delu dehidracije, kjer je rastlina najbolj izpostavljena oksidativnemu stresu (Jovanović in sod., 2011). Vendar se v fazi rehidracije raven 2-D lis ponovno poviša glede na raven lis v fazi izsušitve (preglednica 19). Ponovno povečanje ravni lis 7, 8 in 9 v rehidraciji v odnosu na izsušeno stanje, nakazuje na edinstven odziv rastline ob ponovnem stiku z vodo, kjer rastlina prične z resintezo proteinov in s tem znova vzpostavlja stanje, primerljivo prvotnemu, hidriranemu stanju.

Primerjava 2-D proteinskih profilov v fazah izsušitve in rehidracije glede na kontrolo nam omogoča opazovanje proteinskega odziva rastline na pomanjkanje vode ter opazovanje njene sposobnosti vzpostavitve prvotnega stanja po ponovnem vlaženju. Pri študijah 2-D profilov v stanjih dehidracije in rehidracije je poleg primerjav posameznih faz s kontrolo, pomembna tudi primerjava med fazama izsušitve in rehidracije. Slednja primerjava nam natančneje prikaže ključne mehanizme potrebne za učinkovit prehod rastline iz anabioze v ponovno aktivno stanje.

Če primerjamo našo študijo s študijo 2-D elektroforeze *R.serbica* (Franko 2010) lahko vidimo velike razlike med proteinskima profiloma posameznih sorodnih rastlin. Pri preučevanju proteinskih profilov *R. serbica* z 2-D elektroforezo so v fazi popolne izsušitve opazili velike spremembe v primerjavi s proteinskim profilom kontrolnih rastlin, saj je bilo vidnih veliko število novih proteinov, od katerih so uspeli identificirati Rubisco (Franko, 2010). Žal je genom obeh rastlinskih vrst še nepoznan, zato je težko napovedati vzroke za opažene razlike v izražanju proteinov. Pomembno je še opomniti, da je VV listov izsušene *R.nathaliae*, katerih proteinski profil smo analizirali, pomembno višja od vrednosti VV navedenih za izsušeno *R.serbica*, čeprav se RVV ne razlikujeta (Franko 2010). Če izključimo možne vplive različnih pogojev gojenja rastlin oz. eksperimentalnih napak, je lahko razlog opaženih razlik v proteinskih profilih hidriranih rastlin v specifičnih lastnostih dveh vrst ramond. Lahko le dodamo, da se genoma dveh vrst močno razlikujeta po velikosti ter vsebnosti GC-parov (Šiljak-Yakovlev in sod., 2008).

Tudi sicer je bila sorodna rastlina *R. serbica* na biokemijskem nivoju veliko več proučevana, kar je omenjeno že v pregledu objav. Čeprav se je s proteomsko analizo v okvirju diplomskega dela ukvarjala le Franko (2010), lahko v nekaterih objavah zasledimo podatke o vsebnosti proteinov pri tej rastlini. Tako so Veljović-Jovanović in sod. (2006) ugotovili, da se je količina topnih proteinov v listih *R. serbica* med sušo kar za šestkrat povečala v primerjavi z listi kontrolnih, normalno hidriranih rastlin. S SDS-PAGE elektroforezo so se pri 20 % in 50 % vsebnosti relativne vlage pojavile nove, manjše proteinske lise (Veljović-Jovanović in sod., 2006), ki so lahko posledica proteolize zaradi oksidativnih modifikacij proteinov med izsuševanjem (Davies in sod., 1987). Lahko pa so posledica *de novo* sinteze proteinov, saj se je v tem času zmanjšala tudi količina amino kislin v listih (Zivkovic in sod., 2005).

Posledice večje vsebnosti vode so lahko vidne na proteinskem profilu. V primeru, da rastlina ne doseže stanja izsušitve morebiti ne inducira vseh mehanizmov obrambe, ki bi bili ob popolni izsušitvi vidni na proteinskem profilu.

Proteini, katerih višjo raven smo detektirali v listih izsušene rastline, so verjetno ključni pri preživetju *R. nathaliae* v stanju izsušenosti, ali pa imajo (hkrati) vlogo pri oživitvi rastline ob ponovnem stiku z vodo. Določitev aminokislinske sekvence teh proteinov, kar sicer ni bil predmet tega diplomskega dela, bo naslednja stopnja potrebna za njihovo identifikacijo in morebitno opredelitev njihove funkcije pri edinstvenem odzivu *R. nathaliae* na sušo.

4. 3 ANALIZA FENOLOV V IZVLEČKIH LIOFILIZIRANIH LISTOV HIDRIRANE IN DEHIDRIRANE RASTLINE *Ramonda nathaliae*

S primerjavo 2-D gelov posameznih dehidracijsko-rehidracijskih faz *R. nathaliae* smo opazili spremembe v proteinskem profilu in pojav novih proteinov v fazi dehidracije. S tem smo potrdili proteomsko študijo sicer sorodne *R. serbica* (Franko, 2010). Da smo šli korak dlje v poznavanju rodu *Ramonda*, smo se odločili raziskati morebitne antioksidativne učinkovine *R. nathaliae*, s poudarkom na fenolnih spojinah. Fenolne spojine so dobri antioksidanti in kot takšne lahko predstavljajo učinkovito zaščito lipidov in biološko pomembnih makromolekul v primeru oksidativnega stresa, kateremu so izpostavljene rastline v suši. V okviru naloge smo nameravali določiti skupno vsebnost fenolnih spojin ter na osnovi kromatografske separacije ugotoviti, ali se profila polifenolov v izvlečkih liofiliziranih listov hidriranih in dehidriranih rastlin razlikujeta. Topilo sestavljeno iz 50% etanola, 2% očetne kisline in 48% vode, smo uporabili za pripravo izvlečkov, ki smo jih kromatografirali.

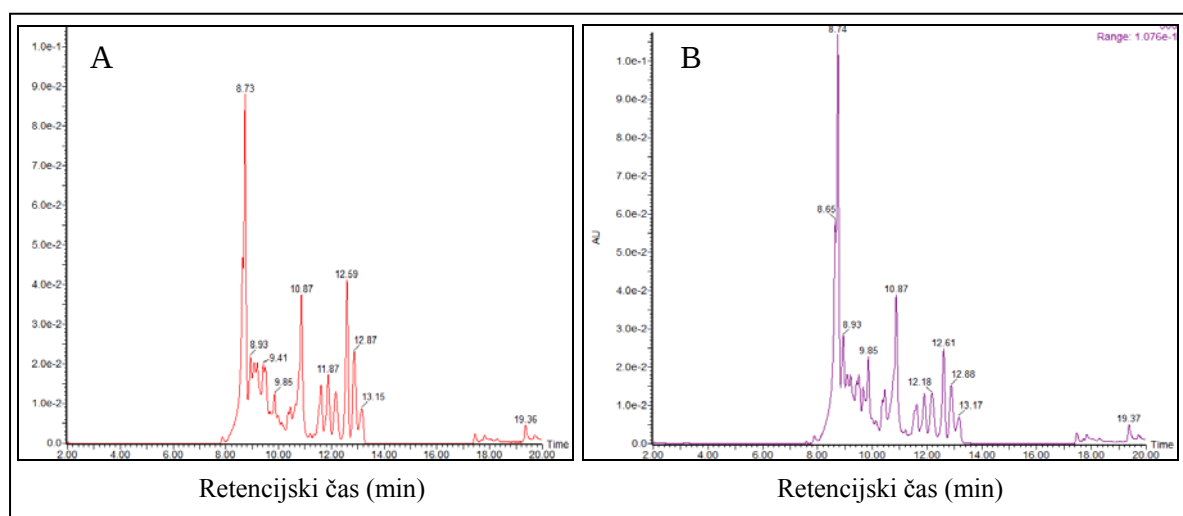
Fenolne spojine so v bioloških materialih pogostokrat vezane na različne manjše organske spojine kot so monosaharidi, oligosaharidi in organske kisline. Nekatere fenolne spojine so vezane tudi na komponente celične stene in se pri ekstrakciji ne izlužijo v raztopino (Naczki in Shahidi, 2004). Da bi lahko analizirali vezane kakor tudi netopne fenolne spojine v *R. nathaliae*, smo alikvote izvlečkov in suhe preostanke rastlinskih listov pred kromatografijo izpostavili kisli hidrolizi. S kislno hidrolizo netopnega preostanka po ekstrakciji lahko dosežemo veliko povečanje vsebnosti polifenolov v primerjavi z ekstraktom, ki ni bil izpostavljen kisli hidrolizi (Arranz in Calisto, 2010).

Pred kromatografijo smo fenolne komponente vezali na ekstrakcijsko kolono, neželene spojine pa odstranili s 15 % raztopino metanola. Separacija fenolnih spojin potekala na reverznofazni koloni z gradientom dveh mobilnih faz, mobilne faze A (1 % (w/v) raztopina metanojske kisline) in mobilne faze B (acetonitril). Spojine, ki imajo polarni značaj, imajo krajši retencijski čas in se prej izločijo iz kolone (retencijski čas < 10 min) kot nepolarne spojine, ki imajo daljši retencijski čas. Fenolne spojine smo ob izhodu iz kolone zaznali z UV detektorjem. Kromatogrami so izrisani pri valovni dolžini 300 nm.

Pri kromatografski analizi fenolov nismo imeli na voljo ustreznih standardov, zato fenolov, ki so se izločili v posameznih kromatografskih vrhovih nismo mogli identificirati. Kljub temu, smo lahko izvedli primerjalno analizo vsebnosti fenolov v izvlečkih listov hidriranih in dehidriranih rastlin. Za posamezne vzorce smo iz kromatogramov ovrednotili površine kromatografskih vrhov, ki so bili dobro ločeni od ozadja. Izračunani integrali za posamezne kromatografske vrhove so v neposredni korelaciji s koncentracijo fenolnih spojin v vzorcu, saj smo v vseh primerih na kolono nanesti enak volumen vzorca. Ker spojin eluiranih pri posameznih retencijskih časih nismo identificirali in ker ne moremo izključiti možnosti, da poleg fenolnih spojin pri 300 nm absorbirajo tudi nekatere druge organske spojine, pričujoča analiza fenolnega profila predstavlja preliminarno študijo.

- Fenolni profil izvlečkov iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov *R. nathaliae*

Fenolni profili izvlečkov hidriranih (A) in dehidriranih (B) listov, pridobljeni s kromatografsko analizo so predstavljeni na sliki 7. Iz prikazanih kromatogramov na sliki 7 je razvidno, da se izvlečka razlikujeta le v koncentraciji posameznih fenolnih spojin, medtem ko sta kvalitativno oba profila precej podobna. Razlike v relativni vsebnosti fenolnih spojin so prikazane v preglednici 20.



Slika 7: Kromatografska analiza fenolnih spojin v izvlečkih listov hidriranih (A) in dehidriranih (B) rastlin *R. nathaliae*. Kromatogrami so izrisani pri valovni dolžini 300 nm.

Preglednica 20: Površine kromatografskih vrhov spojin, ki se eluirajo pri različnih retencijskih časih in relativna primerjava kromatografskih površin pridobljeni po analizi izvlečkov hidriranih (svežih) ter dehidriranih (izsušenih) listov *R. nathaliae*.

Retencijski čas (min) ^a	Površine vrhov izvlečkov		Relativna primerjava kromatografskih površin $P_{\text{hidrirani list}}/P_{\text{dehidrirani list}} (\%)^b$
	Hidrirani listi	Dehidrirani listi	
8,73	14878,3	18756,7	126,1
11,61	2288,1	2037,7	89,1
11,87	2622,7	2102,4	80,2
12,17	2274,1	2490,6	109,5
12,59	4848,6	3226,0	66,5
12,87	3242,2	2364,9	72,9
13,15	1426,6	1131,2	79,3
Skupna površina^c	62395	64697,1	103,7

^aRetencijski čas (min) – retencijski čas je določen na osnovi kromatograma izvlečka hidrirane rastline. Retencijski časi na kromatogramu izvlečka dehidrirane rastline minimalno odstopajo ($\pm 0,02$ min).

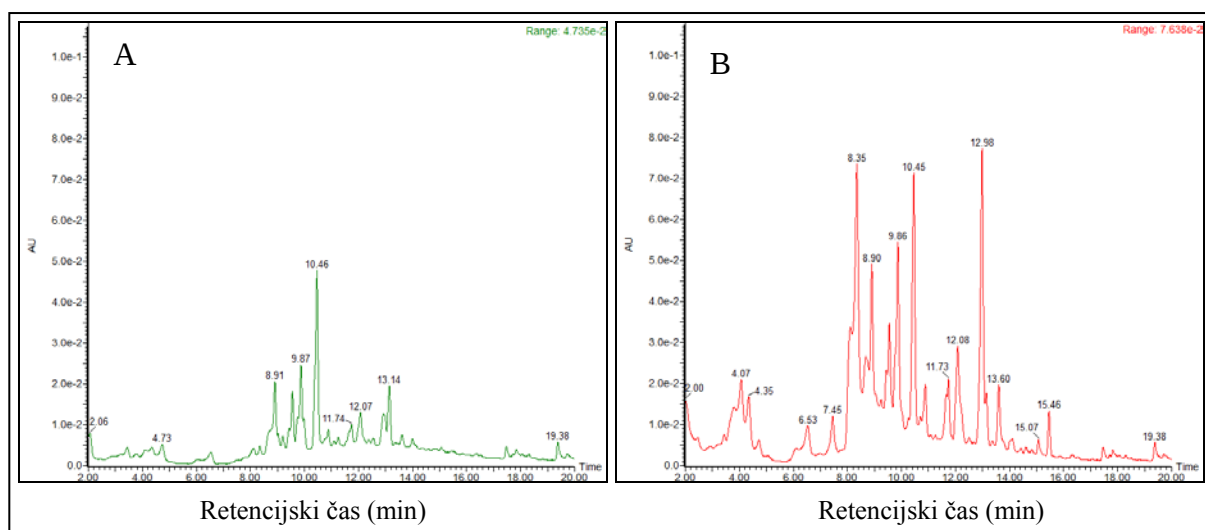
^bRelativna vrednost površin – Kvocient površine kromatografskega vrha v izvlečku iz dehidriranih (izsušenih) listov in površine kromatografskega vrha pri izvlečku iz hidriranih listov izražen v odstotkih.

^cSkupna površina- površina vseh vrhov z retencijskim časom v območju 7-14 minut.

Iz analize prikazane v preglednici 20 je razvidno, da se skupni površini vseh kromatografskih vrhov v obeh ekstraktih le malo razlikujeta. Slednje se sklada z rezultati predstavljenimi v preglednici 24 iz katere je razvidno, da se skupna vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih listov hidriranih in dehidriranih rastlin razlikuje za manj kot 20 %. Analiza kromatografskega profila obeh ekstraktov kljub vsemu razkrije nekaj razlik. Razvidno je, da je v dehidriranih listih večja vsebnost fenolne spojine, ki se eluirajo prva ($t_r = 8,73$), medtem ko je v hidriranih listih večja vsebnost manj polarnih fenolnih spojin ($t_r = 12,59$; 12, 87 in 13,15). Pri sorodni rastlini *R. serbica* so Sgherri in sod. (2004) analizirali vsebnost fenolnih spojin tekom dehidracijske/rehidracijskega cikla, kjer so v fazi izsušitve zaznali manjšo celokupno vsebnost fenolnih spojin v primerjavi s hidriranimi rastlinami. Izpostaviti pa je potrebno, da so v omenjeni študiji uporabili različno metodo ekstrakcije in detekcije fenolnih spojin. Do razlik je lahko prišlo tudi zaradi tega, ker ne gre za isti vrsti, ki se posledično lahko tudi drugače odzoveta na sušni stres, kar smo ugotovili že pri primerjavi proteoma hidrirane in dehidrirane rastline (Franko 2010 in slika 6 v moji diplomski nalogi).

- Fenolni profil izvlečkov iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov *R. nathaliae* po kisli hidrolizi

Fenolni profili izvlečkov hidriranih (A) in dehidriranih (B) listov po kisli hidrolizi, pridobljeni s kromatografsko analizo so predstavljeni na sliki 8. Iz prikazanih kromatogramov na sliki 8 je razvidno, da se s kislino obdelana izvlečka hidriranih in dehidriranih rastlin zelo razlikujeta tako v kvalitativnem kot v kvantitativnem smislu. Razlike v relativni vsebnosti fenolnih spojin so prikazane v preglednici 21.



Slika 8: Kromatografska analiza fenolnih spojin v izvlečkih listov hidriranih (A) in dehidriranih (B) rastlin *R. nathaliae* po kisli hidrolizi. Kromatogrami so izrisani pri valovni dolžini 300 nm.

Kot je razvidno na sliki 8 se kot rezultat kisle hidrolize v izvlečkih tvorijo številne nove komponente, ki absorbirajo pri 300 nm in jih v vzorcih, ki niso bili obdelani s kislino nismo identificirali. Velja tudi obratno, saj spojin, ki smo jih identificirali brez kisle hidrolize, po hidrolizi s H_2SO_4 nismo več identificirali. Vidni so novi vrhovi pri nižjih in višjih retencijskih časih, kar kaže na pojav novih polarnih in nepolarnih spojin. Pri izvlečkih, ki niso bili izpostavljeni kisli hidrolizi (slika 7), lahko vidimo, da je močno zastopan vrh pri retencijskem času 8,73, ki pa v izvlečkih po kisli hidrolizi ni več viden. Pri nižjem pH se cepijo predvsem glikozidne vezi, v manjši meri pa tudi estrske in etrske vezi (Arranz in Calixto, 2010). V primeru hidrolize bi pričakovali manjšo kompleksnost kromatografskega profila, saj naj bi se različni glikozidni derivati pretvorili v manjše število fenolov. Ker se je kompleksnost vzorca še povečala, lahko predvidevamo, da je poleg hidrolize vezi pri kislem pH in povišani temperaturi prišlo tudi do nastanka različnih derivatov fenolnih spojin, kakor tudi obarvanih produktov, ki nastanejo po dehidraciji monosaharidov.

Preglednica 21: Površine kromatografskih vrhov spojin, ki se eluirajo pri različnih retencijskih časih in relativna primerjava kromatografskih površin pridobljeni po analizi izvlečkov hidriranih (svežih) ter dehidriranih (izsušenih) listov *R. nathaliae* po kisli hidrolizi.

Retencijski čas (min) ^a	Površine vrhov izvlečkov		Relativna primerjava kromatografskih površin $P_{\text{hidrirani list}}/P_{\text{dehidrirani list}}$ (%) ^b
	Hidrirani listi	Dehidrirani listi	
8,11	993,8	6294,4	633,4
8,35	778,2	14354,8	1844,7
8,9	2418,7	6309,0	260,8
9,55	3217,4	6188,5	192,3
9,86	5086,8	10394,8	204,3
10,45	6573,5	10755,8	163,6
10,88	1233,4	2901,8	235,3
11,73	2161,0	4699,3	217,5
12,08	2947,5	6555,8	222,4
12,98	2809,8	10776,0	383,5
13,14	2539,6	1632,1	64,3
13,6	1262,1	2680,0	212,3
Skupna površina^c	50125,0	114369,0	228,2

^aRetencijski čas (min) – retencijski čas je določen na osnovi kromatograma izvlečka hidrirane rastline. Retencijski časi na kromatogramu izvlečka dehidrirane rastline minimalno odstopajo ($\pm 0,02$ min).

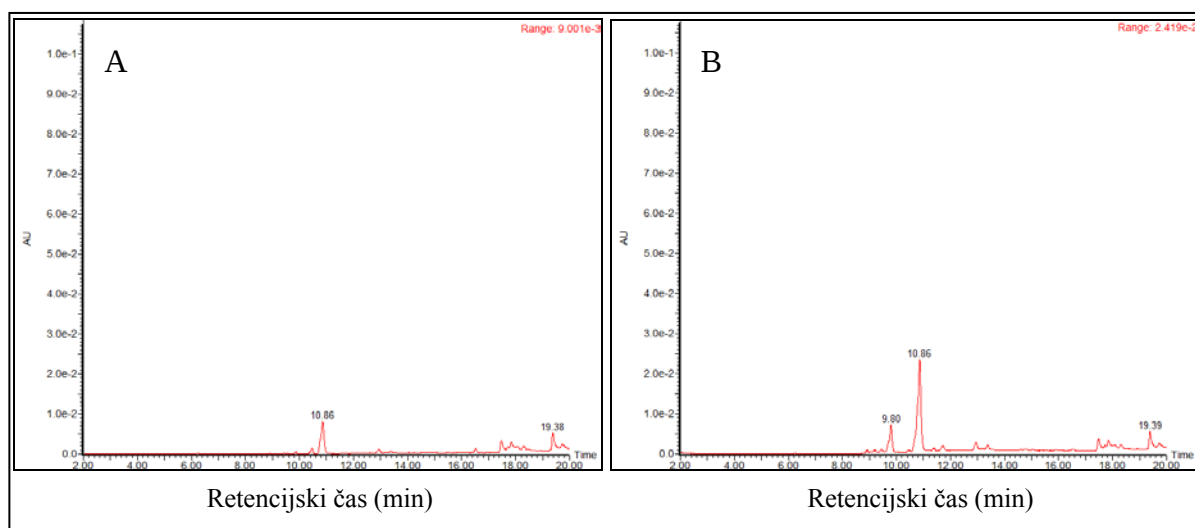
^bRelativna vrednost površin – Kvocient površine kromatografskega vrha v izvlečku iz dehidriranih (izsušenih) listov in površine kromatografskega vrha pri izvlečku iz hidriranih listov izražen v odstotkih.

^cSkupna površina- površina vseh vrhov z retencijskim časom v območju 7-14 minut.

Iz podatkov o skupni površini kromatografskih vrhov vidimo, da je v izvlečkih iz izsušenih listov *R. nathaliae* kar dvakrat večja vsebnost spojin, ki absorbirajo pri 300 nm (preglednica 21). V primeru, ko izvlečkov nismo obdelali s kislino, so bile razlike med skupnima integraloma in integrali posameznih kromatografskih vrhov precej manjše (preglednica 20). Ker nismo izvedli večjega števila ponovitev, je možno, da so bile razmere v katerih je potekala hidroliza obeh vzorcev, drugačne. Ne moremo pa tudi izključiti možnosti, da spojine, ki absorbirajo pri 300 nm niso nastale s hidrolizo oziroma z modifikacijo fenolnih spojin, ki smo jih ovrednotili v razmerah brez kisle hidrolize.

- Fenolni profil izvlečkov pripravljenih s kislno hidrolizo v ekstrakcijskem topilu netopnih ostankov hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov *R. nathaliae*

S kislno hidrolizo netopnih ostankov po ekstrakciji smo želeli ugotoviti, ali lahko na ta način povečamo topnost fenolnih spojin, ki so vezane v netopen matriks. Na kromatogramih na sliki 9 lahko vidimo, da je v primerjavi s topnimi fenolnimi spojinami le manjši delež kovalentno vezanih na slabo topne strukture kot je npr. celična stena. Pri nekaterih drugih matriksih kot so npr. pšenični otrobi (Arranz in Calixto 2010), je delež kovalentno vezanih fenolnih spojin, ki se sprostijo s kislno hidrolizo večji v primerjavi s fenolnimi spojinami, ki se izlužijo z ekstrakcijskim pufrom.



Slika 9: Kromatografska analiza fenolnih spojin netopnih preostankov po ekstrakciji listov hidriranih (A) in dehidriranih (B) rastlin *R. nathaliae* izpostavljenih kisli hidrolizi. Kromatogrami so izrisani pri valovni dolžini 300 nm.

Iz kromatogramov prikazanih na sliki 9 je razvidno, da se po hidrolizi netopnih preostankov dehidriranih listov, sprosti več spojin, ki absorbirajo pri 300 nm, kot pri hidriranih listih. Najbolj je izrazit vrh pri retencijskem času 10,86 minut, ki je skoraj za trikrat večji pri dehidriranem listu (preglednica 22). Kromatografski vrh pri retencijskem času 10,86, smo identificirali tudi pri kisli hidrolizi v ekstrakcijskem topilu topne frakcije (slika 8). Zanimivo, je da je integral za ta kromatografski vrh pri dehidriranem listu večji v primeru kisle hidrolize netopnega preostanka kot pa v primeru kisle hidrolize topnega izvlečka. Iz tega lahko sklepamo, da je večji delež te spojine v rastlini vezan na netopen matriks.

Preglednica 22: Površine kromatografskih vrhov spojin, ki se eluirajo pri različnih retencijskih časih in relativna primerjava kromatografskih površin pridobljeni po analizi netopnih preostankov hidriranih (svežih) ter dehidriranih (izsušenih) listov *R. nathaliae*, izpostavljenih kisli hidrolizi.

Retencijski čas (min) ^a	Površine vrhov izvlečkov		Relativna primerjava kromatografskih površin $P_{\text{hidrirani list}}/P_{\text{dehidrirani list}}$ (%)
	Hidrirani listi	Dehidrirani listi	
8,91	49,78	35,4	71,2
9,8	104,59	811,4	775,8
10,46	182,83	38,3	20,9
10,86	1154,65	3385,9	293,2
12,94	104,51	196,7	188,2
13,37	30,11	92,5	307,2
Skupna površina^c	2775,72	7184,4	258,8

^aRetencijski čas (min) – retencijski čas je določen na osnovi kromatograma izvlečka hidrirane rastline. Retencijski časi na kromatogramu izvlečka dehidrirane rastline minimalno odstopajo ($\pm 0,02$ min).

^bRelativna vrednost površin – Kvocient površine kromatografskega vrha v izvlečku iz dehidriranih (izsušenih) listov in površine kromatografskega vrha pri izvlečku iz hidriranih listov izražen v odstotkih.

^cSkupna površina- površina vseh vrhov z retencijskim časom v območju 7-14 minut.

Fenolne spojine v *R. nathaliae* niso še raziskane, zato bi za natančnejšo analizo fenolnih profilov in identifikacijo posameznih vrhov bila potrebna optimizacija kromatografske separacije, kot tudi ekstrakcijskih metod in hidrolize. Raznoliki profili fenolnih spojin, dobljeni s kromatografsko separacijo listnih izvlečkov *R. nathaliae*, so podali izhodišče za nadaljnjo raziskavo potencialnih antioksidativnih komponent rastline.

4. 4 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE RAZLIČNO PRIPRAVLJENIH LISTNIH IZVLEČKOV RASTLINE *Ramonda nathaliae*

Rastlina *R. nathaliae* je kot rastlina tolerantna na izsušitev potencialni vir bioaktivnih učinkovin. Ker smo iz rastlinskega materiala želeli ekstrahirati čim več aktivnih spojin, smo najprej izvedli preliminarni poskus, kjer smo izbrali najustreznejše topilo za pripravo izvlečkov. Ekstrakcijo hidriranih (svežih) in izsušenih listov smo preizkusili v različno polarnih topilih ter določili vsebnost fenolnih spojin v izvlečkih (preglednica 23) z metodo po Folinu.

Preglednica 23: Preliminarna določitev koncentracije fenolnih spojin izražena kot masni ekvivalent galne kisline (GK) na liter ekstrakta (γ_{GK} / L) in kot masni delež galne kisline (masni ekvivalent) v suhi snovi (W/W) liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline *Ramonda nathaliae*.

Vrsta topila	Hidrirani listi		Izsušeni listi	
	γ (g_{GK}/L)	Delež GK v suhi snovi (%)	γ (g_{GK}/L)	Delež GK v suhi snovi (%)
96 % etanol	5,93	11,86 (w/w)	3,88	7,76 (w/w)
50 % etanol	3,09	6,17 (w/w)	2,61	5,21 (w/w)
50 % etanol+2 % očetna kislina	6,90	13,80 (w/w)	5,95	11,90 (w/w)
100 % aceton	2,67	5,35 (w/w)	0,93	1,87 (w/w)
50 % aceton	3,74	7,47 (w/w)	3,16	6,33 (w/w)
50 % aceton +2 % očetna kislina	6,67	13,34 (w/w)	6,16	12,32 (w/w)

4.4.1 *In vitro* določanje vsebnosti fenolnih spojin v izvlečkih pripravljenih z različnimi topili – metoda po Folinu

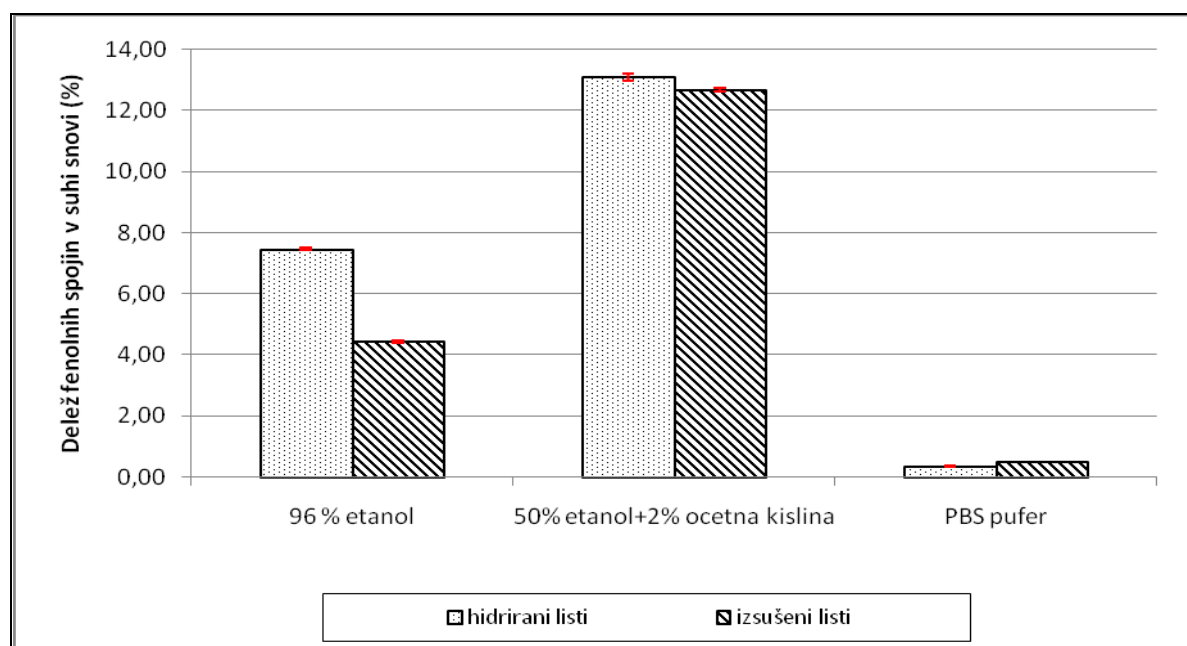
Na podlagi rezultatov preliminarne analize izbranih topil smo se odločili, da bomo pripravili ekstrakte s 50 % etanolom z 2 % očetno kislino ter s 96 % etanolom (preostanek deleža topil je voda). Pri prvem topilu smo določili največji delež fenolnih spojin v suhi snovi, pri drugem topilu pa manjši delež fenolnih spojin (preglednica 23), vendar sta izbrani topila najbolje ohranili zelen pigment izvlečkov v primerjavi z ostalimi izvlečki, ki so se sčasoma obarvali rjavo. Predpostavili smo, da ohranjen pigment kaže na zmanjšano verjetnost nastanka oksidiranih produktov, ki niso več antioksidativno aktivni. Z namenom, da bi raziskali tudi morebitne vodotopne rastlinske učinkovine, smo pripravili ekstrakte tudi v PBS pufru (vodni izvleček).

Z izbranimi topili smo pripravili izvlečke iz listov hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov *R. Nathaliae*. Za oceno potencialnega antioksidativnega delovanja izvlečkov smo izbrali metodo po Folinu, saj velja za ustrezno in ponovljivo metodo za določanje celokupne vsebnosti fenolov (Huang in sod., 2005; MacDonald-Wicks in sod., 2006). Na določanje fenolnih spojin smo se osredotočili predvsem, ker so rastlinski materiali pomemben vir fenolnih spojin (Harborne, 1999). Fenolne spojine lahko zaradi prisotnih -OH skupin v svoji strukturi stabilizirajo proste radikale in kompleksirajo kovinske ione ter na ta način delujejo antioksidativno.

Preglednica 24: Vsebnost fenolnih spojin izražena kot masni ekvivalent galne kisline (GK) na liter ekstrakta (g_{GK} / L) in kot masni delež galne kisline (masni ekvivalent) v suhi snovi (W/W) liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in suhe rastline *Ramonda nathaliae*.

Hidrirani (sveži) listi			Dehidrirani (izsušeni) listi		
Topilo	γ (g_{GK}/L)	Delež GK v suhi snovi (%)	Topilo	γ (g_{GK}/L)	Delež GK v suhi snovi (%)
96 % etanol	3,73	7,47 (w/w)	96 % etanol	2,22	4,44 (w/w)
50% etanol z 2% ocetna kislina	6,54	13,09 (w/w)	50% etanol z 2% ocetna kislina	6,34	12,67 (w/w)
PBS pufer (vodni izvleček)	0,17	0,35 (w/w)	PBS pufer (vodni izvleček)	0,24	0,49 (w/w)

Kot je razvidno iz rezultatov prikazanih v preglednici 24 ter na sliki 10 je imel izvleček, pripravljen s 50 % etanolom, 2 % očetno kislino in 48 % vodo največjo vsebnost fenolnih spojin. Manjšo vsebnost fenolnih spojin smo določili izvlečku pripravljenim s 96 % etanolom. V izvlečku s PBS puferom (vodni izvleček) je bila vsebnost fenolnih spojin za več kot velikostni razred manjša kot v obeh ostalih izvlečkih na osnovi etanola. Vodni izvlečki so bili po končani ekstrakciji tudi nekoliko rjavo obarvani, verjetno zaradi oksidacijskih procesov, saj pri pogojih ekstrakcije nismo inaktivirali encimov kot so polifenol-oksidge. Etanol oziroma dodatek očetne kisline sta pripomogla k denaturaciji oksidaz ter tako preprečila rjavenje (oksidacijo) izvlečkov.



Slika 10: Vsebnost fenolnih spojin izražena kot masni delež galne kisline (masni ekvivalent) v suhi snovi (W/W) liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in dehidrirane (izsušene) rastline *Ramonda nathaliae*.

Če primerjamo vsebnost fenolnih spojin med hidriranimi (svežimi) in izsušenimi listi (slika 10), opazimo največjo razliko v deležu fenolnih spojin v primeru izvlečka, pripravljenega s 96 % etanolom, medtem ko je pri ostalih dveh izvlečkih razlika manj izrazita. Sgherri in sod., (2004) so raziskovali vsebnost celokupnih fenolnih spojin v sorodni rastlini *R. serbica*,

tekom različnih faz dehidracijsko-rehidracijskega cikla. Študija je pokazala zmanjšanje celokupne vsebnosti fenolnih spojin kot rezultat dehidracije. Vsebnost fenolnih spojin je zopet narasla v prvih urah rehidracije, ki je za rastlino najbolj stresna faza. V naši študiji smo primerjali vsebnost fenolnih spojin izvlečkov le v zadnji fazi dehidracije, kjer je vidno zmanjšanje vsebnosti fenolnih spojin le pri izvlečku, pripravljenim s 96 % etanolom. Pri ostalih dveh uporabljenih topilih razlika v določeni vsebnosti med hidrirano in dehidrirano rastlino ni velika.

4.4.2 In vivo določanje antioksidativnega delovanja izvlečkov *Ramonda nathaliae*, pripravljenih z različnimi topili

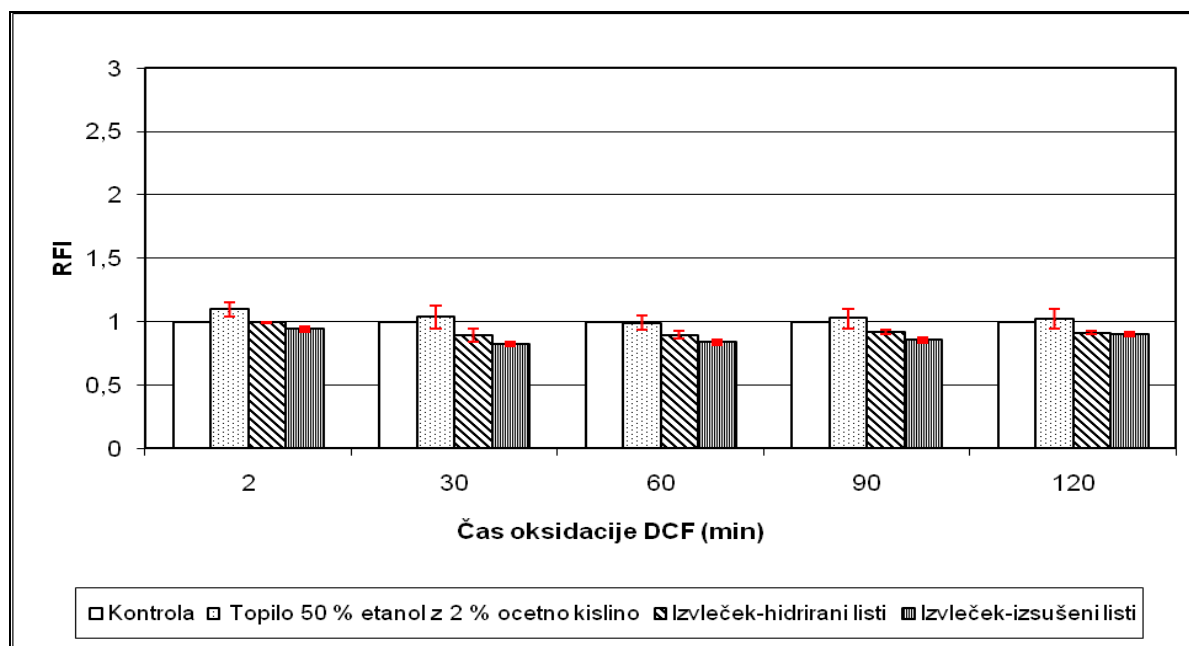
Za nadaljnje študije izvlečkov liofiliziranih listov hidrirane (sveže) in izsušene rastline *R. nathaliae* smo morali določiti ustrezne volumne, ki smo jih uporabili za tretiranje celic modelnega organizma kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. S preizkušanjem različnih volumnov izvlečkov, dodanih v suspenzijo kvasnih celic, smo se odločili dodajati po 100 μ L etanolnih izvlečkov v 9,9 ml kvasne suspenzije. Večji volumni izvlečkov so namreč povzročili agregacijo v suspenziji kvasnih celic. Ker je bila vsebnost fenolnih spojin pri izvlečkih pripravljenih v PBS pufru (vodni izvlečki) približno 10-krat manjša, in ker vodni izvlečki ob dodatku v suspenzijo kvasnih celic niso agregirali, smo dodali 1 mL izvlečka v 9 ml suspenzije kvasnih celic. Tako je bila končna ocenjena koncentracija fenolnih spojin v celični suspenziji pri vseh uporabljenih izvlečkih približno med 0,02 g/L in 0,06 g/L.

Celice kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo izpostavili izvlečkom iz hidriranih (svežih) in izsušenih listov rastline *R. nathaliae*, ki smo jih pripravili z vsemi tremi topili. Po dvourni izpostavitvi smo antioksidativno delovanje ovrednotili z merjenjem znotrajcelične oksidacije, celične energijske metabolne aktivnosti ter lipidne peroksidacije.

4.4.2.1 Določanje znotrajcelične oksidacije:

- Izvlečki pripravljeni s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino (48 % voda)

Na sliki 11 so prikazani rezultati določanja vpliva delovanja izvlečkov hidriranih in izsušenih listov, pripravljenih s 50 % etanolom, 2 % očetno kislino na znotrajcelično oksidacijo. Izvlečku je bila po Folinovi metodi določena največja vsebnost fenolnih spojin (preglednica 24) med izvlečki preučevanimi v okviru naše študije.



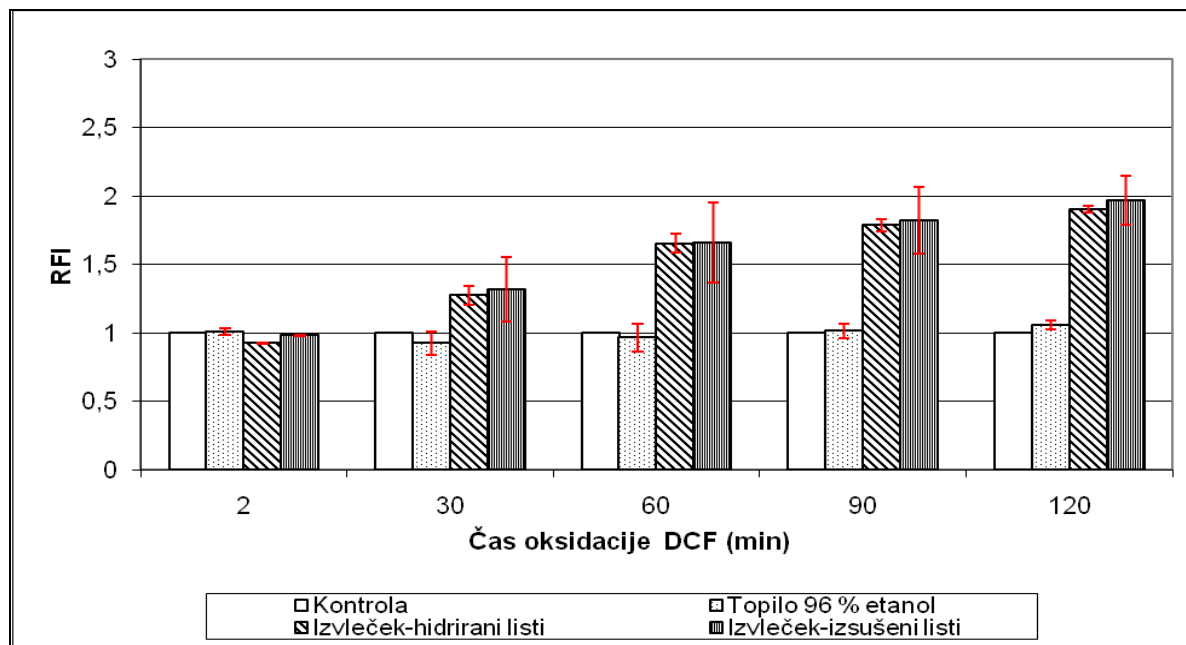
Slika 11: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po tretiranju s topilom ter rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov pripravljenih s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino. Rezultati so predstavljeni kot relativna fluorescenčna intenziteta glede na kontrolo (RFI) v različnih časovnih intervalih od začetka tretiranja s prikazanimi standardnimi odkloni med biološkima ponovitvama posameznih tretiranih vzorcev.

Znotrajcelična oksidacija se je v primeru zgoraj omenjenega izvlečka pri obeh bioloških ponovitvah nekoliko zmanjšala v primerjavi s kontrolno suspenzijo kvasnih celic, ki ni bila izpostavljena toplu in izvlečkom. Kot je razvidno na sliki 11 samo topilo ni imelo vpliva na povečanje oziroma zmanjšanje znotrajcelične oksidacije, kar nakazuje na potencialno antioksidativno delovanje izvlečkov. Znotrajcelična oksidacija se ni zmanjšala v tolikšni meri, kot smo pričakovali glede na *in vitro* določeno vsebnost fenolnih spojin v izvlečkih. Čeprav je v izvlečku veliko fenolov oz. snovi s potencialno antioksidativno aktivnostjo, je možno, da izrazitejšega učinka nismo zaznali, ker večji delež polifenolnih antioksidantov ni vstopil v celice. Vzrok je verjetno v njihovi kompleksni sestavi. Fenolne spojine, topne v etanolno/vodnih raztopinah se lahko nahajajo v bodisi prosti bodisi vezani obliki. V svoji strukturi imajo veliko hidoksilnih skupin, na katere se lahko z glikozidno vezjo vežejo sladkorne ali druge organske komponente prisotne v izvlečkih in tako tvorijo komplekse, ki ne morejo prehajati v celico (Clifford, 1999). Ta predpostavka se sklada z dejstvom, da je fenolni profil z LC-UV analizo izvlečkov po kisli hidrolizi pokazal, da se tvorijo novi produkti. Te snovi bi morda bolj znižale znotrajcelično oksidacijo, vendar v diplomskem delu tega nismo preverjali.

Tako kot v primeru *in vitro* določanja vsebnosti celokupnih fenolnih spojin, tudi pri *in vivo* določanju znotrajcelične oksidacije nismo zaznali razlik v delovanju izvlečkov hidriranih (svežih) in izsušenih listov rastlin (slika 11). Prav tako ni bilo opaznih večjih razlik pri LC-UV analizi fenolnih profilov med izvlečkoma iz hidriranih in izsušenih listov (slika 7).

- Izvlečki pripravljeni s 96 % etanolom (4 % voda)

Znotrajcelična oksidacija se je po tretiranju kvasovk z izvlečki, pripravljenimi z najbolj nepolarnim topilom povečala v primerjavi s kontrolo (slika 12).



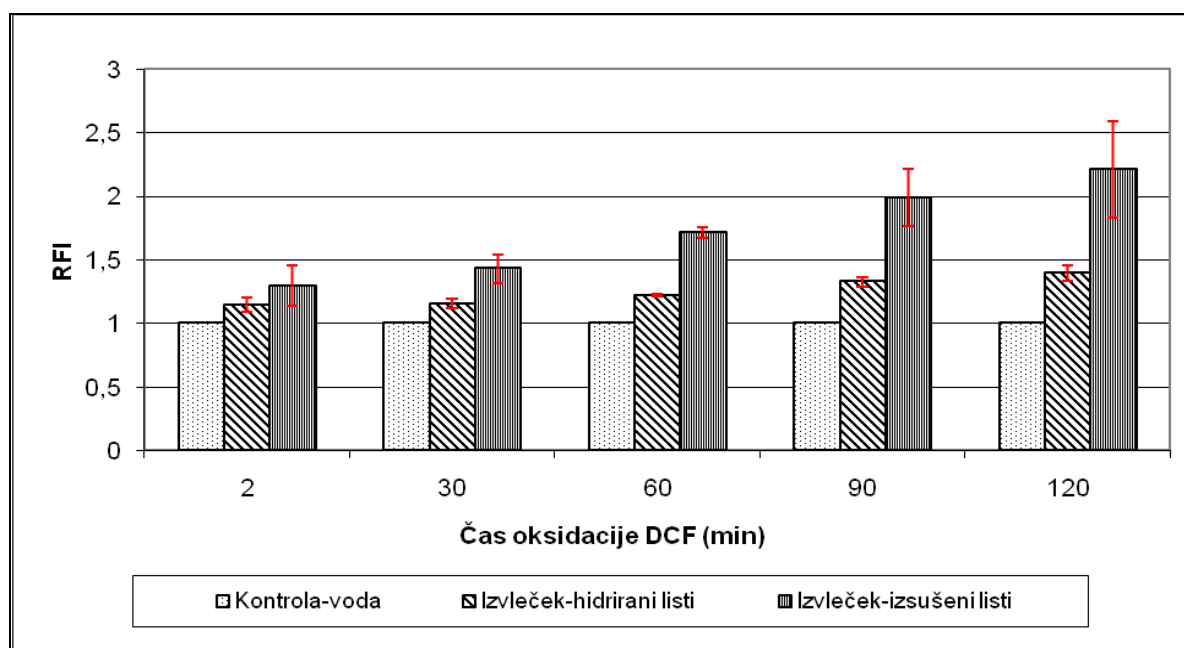
Slika 12: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po tretiranju s topilom ter rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih listov), pripravljenih s 96 % etanolom. Rezultati so predstavljeni kot relativna fluorescenčna intenziteta glede na kontrolo (RFI) v različnih časovnih intervalih od začetka tretiranja s prikazanimi standardnimi odkloni med biološkima ponovitvama posameznih tretiranih vzorcev.

Izvlečkom s 96 % etanolom je bila po Folinovi metodi določena manjša vsebnost fenolnih spojin v primerjavi z izvlečki, pripravljenimi s 50 % etanolom in 2 % oetno kislino (preglednica 24). Na podlagi rezultatov prikazanih na sliki 12 lahko sklepamo, da so imeli uporabljeni ekstrakti prooksidativni učinek. Vpliv topila je bil tudi v tem primeru zanemarljiv, kar kaže da so bile v izvlečku prisotne nekatere učinkovine, ki so povečale nivo oksidantov v celicah.

Kot je razvidno iz diagrama na sliki 12, se vpliv na znotrajcelično delovanje med izvlečki iz hidriranih in izsušenih listov ne razlikuje. Oba izvlečka sta v enaki meri povečala znotrajcelično oksidacijo, kljub temu, da smo izvlečkom iz hidriranih listov določili večjo vsebnost fenolnih spojin z metodo po Folinu (preglednica 24) ter pri tretiranju uporabili enake volumne (razredčitve) ekstraktov. Posledično smo z izvlečkom iz hidriranih listov v suspenzijo dodali dvakrat večjo koncentracijo fenolnih spojin določenih s Folinovo metodo. Ker razlik v učinku nismo zaznali, lahko sklepamo, da imajo ekstrakti listov dehidriranih rastlin bolj izražen prooksidativni učinek, oziroma, da prooksidativni učinek ni rezultat delovanja fenolnih spojin, ki smo jih določili s Folinovim reagentom.

- Izvlečki pripravljeni s PBS pufrom (vodni izvlečki)

Kot je pokazano v preglednici 24 je vsebnost fenolnih spojin v vodnih izvlečkih iz hidriranih (svežih) in izsušenih listov rastline *R. nathaliae* najmanjša v primerjavi z etanolnima izvlečkoma. Na podlagi tega smo kvasne celice tretirali z desetkrat večjim volumnom izvlečkov, tako da smo dosegli približno koncentracijo fenolnih spojin (0,02 g/L fenolnih spojin izraženih kot galna kislina), ki je bila primerljiva s koncentracijo fenolnih spojin ostalih izvlečkov v celični suspenziji. Vpliva topila na znotrajcelično oksidacijo kvasovk na tem mestu nismo preverjali, saj smo kot topilo uporabili PBS pufer, v katerem smo pripravljali suspenzijo kvasnih celic.

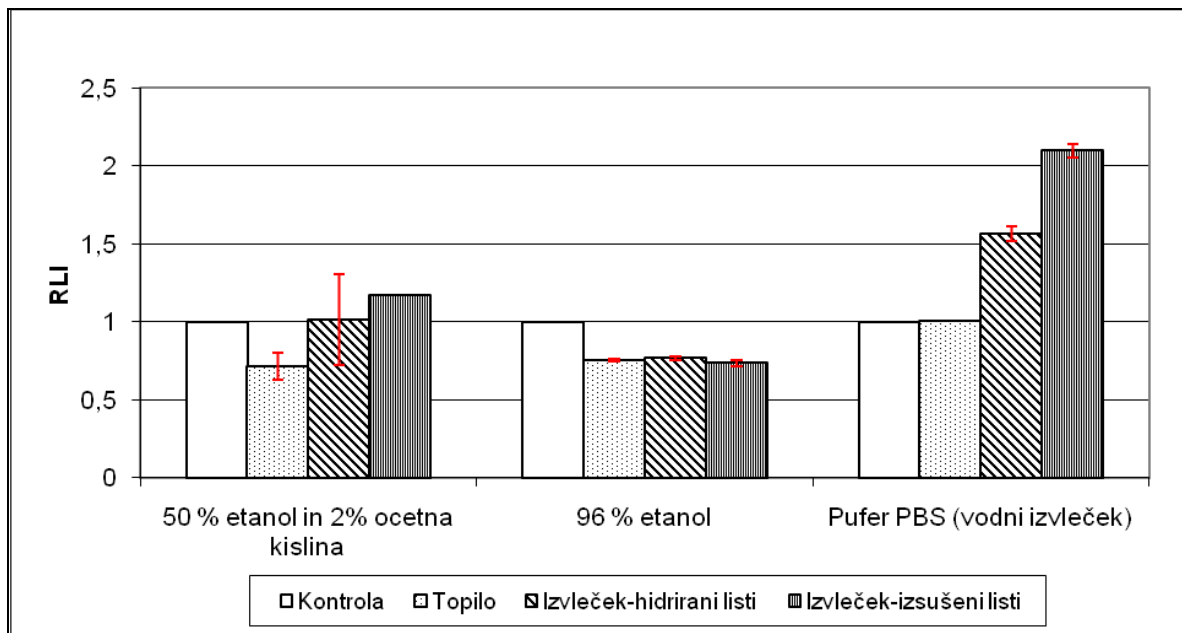


Slika 13: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po tretiranju s topilom ter rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov, pripravljenih s PBS pufrom (vodni izvleček). Rezultati so predstavljeni kot relativna fluorescenčna intenziteta glede na kontrolo (RFI) v različnih časovnih intervalih od začetka tretiranja s prikazanimi standardnimi odkloni med biološkima ponovitvama posameznih tretiranih vzorcev.

Tudi v primeru spojin, ki se ekstrahirajo s PBS ekstrakcijskim pufrom smo določili prooksidativni učinek, ki pa je precej bolj izražen pri ekstraktih pripravljenih iz dehidriranih rastlin (slika 13). V nasprotju z etanolnima topiloma, ki sta denaturirala oksidaze v izvlečkih, so ti v vodnem mediju ostali aktivni in verjetno povzročili nastanek oksidiranih produktov, ki na celice lahko delujejo toksično. Te lahko na kvasne celice delujejo oksidativno, povečajo produkcijo ROS oz. oksidantov in s tem znotrajcelično oksidacijo. Primer takih komponent so lahko kinoni, ki so znani stranski produkti fenolne oksidacije. Dokazan je bil tudi njihov toksičen vpliv na kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* (Rodriguez in sod., 2004). Prooksidativno delovanje vodnih izvlečkov je lahko tudi posledica povečanega volumna dodanih izvlečkov, saj smo hkrati z desetkrat večjim volumnom dodanega ekstrakta povečali tudi vsebnosti ostalih komponent v izvlečkih, npr. redoks aktivnih kovinskih ionov, ki jih z metodo po Folinu ne detektiramo.

4.4.2.2 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

Vzporedno z določanjem znotrajcelične oksidacije smo določali tudi celično energijsko metabolno aktivnost (CEMA). Metoda je občutljiva in temelji na luciferin-luciferazni reakciji, kjer količina ATP sovпада z intenziteto oddane luminiscence (Promega). Količina ATP nam kot učinkovit biomarker za določanje celične metabolne aktivnosti, poda potrebne informacije o celičnem odzivu na delovanje izvlečkov na podlagi metabolne aktivnosti celic.



Slika 14: Znotrajcelična energijska metabolna aktivnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po dvournem tretiranju s tremi topili in tremi vrstami rastlinskih izvlečkov iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov pripravljenih v toplih različnih polarnosti (50 % etanol z dodano 2 % očetno kislino, 96 % etanol, PBS pufer). Rezultati so predstavljeni kot relativna luminiscenčna intenziteta glede na kontrolo (RLI) s prikazanimi standardnimi odkloni med biološkima ponovitvama posameznih vzorcev.

CEMA se je v suspenziji celic tretiranih z izvlečki, pripravljenimi s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino le nekoliko povečala v primerjavi s kontrolo (slika 14). Potrebno pa je omeniti, da je tudi samo topilo zmanjšalo intenziteto luminiscence v celični suspenziji, kar posledično poveča vpliv izvlečkov na CEMA. Razlika med izvlečki pripravljenimi iz hidriranih (svežih) in izsušenih listov *R. nathaliae* je, če upoštevamo standardni odklon med biološkima ponovitvama, zanemarljiva. Rezultati CEMA se skladajo z rezultati znotrajcelične oksidacije (slika 14), saj je bil vpliv izvlečkov pri obeh metodah majhen, vendar ugoden za celično delovanje kvasovk.

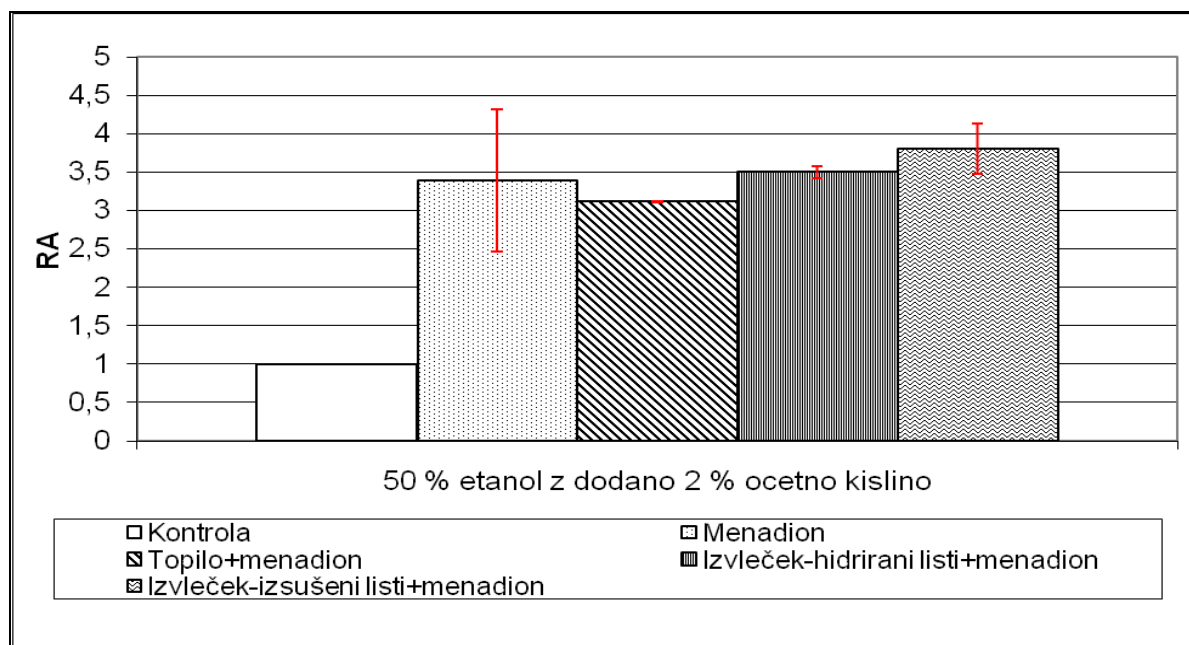
V primeru izvlečka, pripravljenega s 96 % etanolom se je relativna intenziteta luminiscence v celični suspenziji zmanjšala že v primeru samega topila, izvlečki pa dodatno niso prispevali k zmanjšanju. Glede na to, da je bil padec CEMA viden že pri dodatku topila, lahko sklepamo, da ekstrahirane snovi na celično metabolno aktivnost niso imele vpliva.

Vodni izvlečki so povečali CEMA v primerjavi s kontrolo. Ker vodni medij ohranja encimsko aktivnost v ekstraktu, lahko v teh razmerah nastajajo produkti s toksičnim

vplivom na celice. Na povečan nivo teh produktov, se celice lahko odzovejo s povečano sintezo ATP, ki je potrebna za indukcijo obrambnih mehanizmov. Povečano celično metabolno aktivnost pa si lahko razlagamo tudi kot posledico morebitnega prooksidativnega delovanja izvlečkov. Pri vodnih izvlečkih je vidna tudi razlika med izvlečki iz hidriranih in izsušenih rastlinskih listov. Celična energijska metabolna aktivnost je bila povečana v izvlečkih iz hidriranih (svežih) listov (slika 14), kar sovpada s večjo znotrajcelično oksidacijo pri izvlečkih iz izsušenih listov (slika 11).

4.4.2.3 Določanje lipidne peroksidacije

Glede na to, da je najboljše rezultate v smislu antioksidativnega delovanja pokazal izvleček s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino, smo raziskali še njegovo zmožnost pri zaščiti oksidativnih poškodb lipidov.



Slika 15: Lipidna peroksidacija celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po dvournem tretiranju z rastlinskimi izvlečki iz hidriranih (svežih) in dehidriranih (izsušenih) listov pripravljenih s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino ter dvournem tretiranju z menadionom. Rezultati so predstavljeni kot relativne absorbance glede na kontrolo (RA) s prikazanimi standardnimi odkloni med biološkima ponovitvama posameznih vzorcev.

Celice smo za 2 uri izpostavili izvlečku, sledilo je naknadno tretiranje z menadionom kot induktorjem oksidativnega stresa. Rezultati so pokazali, da dvourna izpostavitve izvlečku ni zmanjšala nivoja oksidativnih poškodb lipidov, ki jih je povzročil menadion, saj so vse meritve v okviru eksperimentalne napake (slika 15). Večjo zaščito bi mogoče lahko dosegli z daljšim časom tretiranja.

5 SKLEPI

Uspešno smo pod kontroliranimi pogoji gojili rastline *Ramonda nathaliae*, ki so pred prenosom v Ljubljano rasle v jugovzhodni Srbiji, ter inducirali cikel njihove dehidracije do izsušitve in ponovne oživitve po rehidraciji. Rastline so bile sposobne kljub izsušitvi svojih vegetativnih delov ponovno vzpostaviti življenjske procese.

Pogoji, ki smo jih vzpostavili, so nam omogočili vzorčenje listov *R. nathaliae*, katere smo uporabili za pridobivanje ekstraktov oz. izvlečkov, ki smo jih analizirali tekom diplomskega dela. Le-ti so bili ustrezni za proteomsko analizo oz. za določanje vsebnosti fenolov.

Na ravni proteoma smo v fazi dehidracije opazili spremembo z ozirom na kontrolne, redno zalivane rastline, predvsem v smislu povečanega izražanja več proteinov kot tudi *de novo* sinteze proteinov. Vendar je bilo opazno tudi zmanjšanje zastopanosti nekaterih proteinov. Proteinski profil ekstraktov rehidriranih listov je pokazal stanje primerljivo z ekstrakti listov kontrolnih rastlin.

Iz kromatografskega profila analiziranih polifenolov je razvidno, da se izvlečka, pripravljena iz listov kontrolnih rastlin in listov izsušenih rastlin razlikujeta v relativni koncentraciji posameznih polifenolov.

Po kisli hidrolizi izvlečka se tvorijo nove fenolne spojine. Razlike v kromatografskih profilih listov kontrolnih in izsušenih rastlin so večje kot v primeru, ko nismo izvajali kisle hidrolize.

Polarnost topila uporabljenega za ekstrakcijo ima velik vpliv na določeno vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu. Največja vsebnost fenolnih spojin je bila določena v izvlečkih listov *R. nathaliae*, pripravljenih s 50 % etanolom in dodano 2 % očetno kislino najmanjša pa v izvlečkih pripravljenih s fosfatnim pufrom.

Z ekstrakcijskim topilom pripravljenim s 50 % etanolom in 2 % očetno kislino je masni delež fenolnih spojin v suhi snovi, izražen kot delež galne kisline večji kot 12 %, tako v listih kontrolnih rastlin kot v listih izsušenih rastlin.

Izvlečki pripravljeni z različnimi topili so se razlikovali v vplivu na znotrajcelično oksidacijo. V primeru izvlečka s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno kislino se je znotrajcelična oksidacija zmanjšala v primerjavi s kontrolo, medtem ko je dodatek izvlečkov pripravljenih v 96 % etanolu in fosfatnem pufru povečal znotrajcelično oksidacijo.

Izvlečki pripravljeni v etanolnih topilih so pokazali minimalne razlike med hidriranimi (svežimi) in izsušenimi listi v vplivu na znotrajcelično oksidacijo celic. Vodni izvlečki hidriranih listov so bolj povečali nivo oksidantov v celicah kot ekstrakti suhih listov.

Celična energijska metabolna aktivnosti celic se je malo povečala v primeru izvlečka s 50 % etanolom z dodano 2 % očetno ter nekoliko bolj v primeru izvlečka s fosfatnim pufrom.

Vpliv topila je bil pri obeh primerih zanemarljiv. Izvlečki s 96 % etanolom, kot tudi samo topilo so znižali nivo ATP v celicah.

Razlika med vplivom izvlečkov iz listov kontrolnih rastlin in izsušenih rastlin na celično energijsko metabolno aktivnost je bila opazna le pri izvlečkih v fosfatnem pufru, kjer so izvlečki iz izsušenih listov dodatno povečali CEMA. V primeru etanolnih izvlečkov razlike med listi nismo opazili.

Izvlečki pripravljani s 50 % etanolom z dodano 2 % ocatno kislino niso zaščitili celičnih membran pred lipidno peroksidacijo, ki jo je povzročil menadion.

6 POVZETEK

Majhna skupina višjih rastlin je sposobna prestatl daljša obdobja brez vode in nato ob ponovnem stiku z vodo popolnoma regenerirati svoja vegetativna tkiva ter nadaljevati vse pomembne življenjske procese. Mednje uvrščamo tudi rastlino *Ramonda nathaliae*, ki zaradi svoje posebnosti predstavlja potencialni vir bioaktivnih učinkovin, ki so bile predmet našega zanimanja. V diplomski nalogi smo želeli natančneje opredeliti razlike med izsušenimi in ponovno rehidriranimi rastlinami, predvsem s proteomskega in fenolnega vidika. Rastline, ki smo jih dobili iz Srbije, kjer v določenih predelih rastejo kot endemo-relikti, smo najprej v kontroliranih pogojih gojili ter izpostavili suši, nato pa še rehidraciji, ko so iz izsušenega stanja ponovno oživele. Iz rastlin v omenjenih dveh stanjih in iz kontrolnih, redno zalivanih rastlin smo pripravili ekstrakte listov, v katerih smo preučevali proteinski profil in vsebnost nekaterih bioaktivnih učinkovin ter vpliv slednjih na znotrajcelično oksidacijo celično energijsko metabolno aktivnost ter lipidno peroksidacijo pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*.

Proteomska analiza je pokazala, da se v fazi suše poveča izražanje mnogih proteinov kot tudi, da pride do *de novo* sinteze nekaterih proteinov. Proteinski profil rehidriranih rastlin pa je bil primerljiv s profilom hidriranih listov kontrolnih rastlin.

Izvečkom pripravljenim s 50 % etanolom z dodano 2 % oetno kislino smo s kromatografsko separacijo določili tudi fenolni profil, ki nam je potrdil, da imajo izvlečki kompleksno sestavo. Po kisli hidrolizi izvlečka se tvorijo nove fenolne spojine. Razlike v kromatografskih profilih listov kontrolnih in izsušenih rastlin so večje kot v primeru, ko nismo izvajali kisle hidrolize.

Z namenom raziskovanja nekaterih bioaktivnih učinkovin rastline, smo pripravili izvlečke iz liofiliziranih listov redno zalivanih rastlin ter listov dehidriranih (izsušenih) rastlin *R. nathaliae* v različnih topilih. S Folinovim reagentom smo določili koncentracijo fenolnih spojin v izvlečkih in izračunali delež fenolnih spojin v suhi snovi. Največja vsebnost fenolnih spojin je bila določena v izvlečkih listov *R. nathaliae*, pripravljenih s 50 % etanolom in dodano 2 % oetno kislino najmanjša pa v izvlečkih pripravljenih s fosfatnim pufrom. Vpliv antioksidativnega delovanja izvlečkov, pripravljenimi z različnimi topili smo *in vivo* določevali na kvasovki *S. cerevisiae*. Med izvlečki so le tisti pripravljeni s 50 % etanolom z dodano 2 % oetno kislino nekoliko znižali znotrajcelično oksidacijo, medtem ko so jo izvlečki s 96 % etanolom in fosfatnim pufrom povišali. Izvlečki pripravljeni v etanolnih topilih so pokazali minimalne razlike med listi kontrolnih rastlin in izsušenimi listi v vplivu na znotrajcelično oksidacijo celic. V primeru vodnih izvlečkov pa so hidrirani listi bolj povečali nivo oksidantov v celicah. Celična metabolna aktivnost se je povišala v primeru izvlečkov s 50 % etanolom z dodano 2 % oetno kislino in pri vodnih izvlečkih, medtem ko se je v primeru 96 % etanola znižala. Razlika med vplivom izvlečkov iz listov hidriranih in izsušenih rastlin na celično energijsko metabolno aktivnost je bila opazna le pri vodnih izvlečkih, kjer so izvlečki iz suhih listov dodatno povečali CEMA. V primeru etanolnih izvlečkov je bila razlika med vplivi izsušenih in hidriranih listov zanemarljiva. Izvečkom s 50 % etanolom z dodano 2 % oetno kislino, ki so zmanjšali znotrajcelično oksidacijo, smo preverili še njihovo morebitno vlogo v zašiti oksidacije membran, ki pa je nismo uspeli dokazati.

Na podlagi proteinskega profila, fenolnega profila in vseh ostalih študij lahko povzamemo, da je *Ramonda nathaliae* sposobna preživeti daljša sušna obdobja zaradi delovanja več med seboj vzajemnih celičnih mehanizmov. Ti skupno delujejo kot učinkovit sistem, ki tem svojevrstnim rastlinam dajejo sposobnost preživetja pri zelo majhni vsebnosti vode ter oživitev ob ponovnem stiku z vodo. Natančno poznavanje celotnega proteoma in manjših bioaktivnih komponent bi lahko prineslo nova znanja o prilagajanju rastlin na stanje skoraj popolne izsušitve. Spojine z antioksidativno/prooksidativno aktivnostjo imajo tudi potencialno aplikacijo v farmaciji in kot prehranski dodatki.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Al-Gubory K., Fowler P.A., Garrel C. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42, 10: 1634-1650
- Apak R., Güclü K. G., Özürek M., Karademir S. E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981
- Arranz S., Calixto F.S. 2010. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. *Journal of Cereal Science*, 51: 313-318
- Asada. K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. V: Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Foyer C.H., Mullineaux P.M. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 77-104
- Asada K., Nakano Y. 1987. Affinity for oxygen and scavenging of hydrogen peroxide in spinach chloroplast. *Photochemistry in Photobiology*, 28: 917-920
- Ashrafi K., Sinclair D., Gordon J. I., Guarante L. 1999. Passage through stationary phase advances replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9100-9105
- Atlas R. M., Lawrence P. 1996. *Handbook of microbiological media*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press: 2051 str.
- Augusti A., Scartazza A., Navari-Izzo F., Sgherri C. L. M., Stevanović B., Brugnoli E. 2001. Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the psikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Photosynthesis Research*, 67: 79-88
- Bartels D. 2005. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 5: 696-701
- Bartels D., Alexander K., Schneider R., Elster R., Velasco J., Alamillo G., Nelson D., Salamini F. 1993. Desiccation –related gene products analysed in a resurrection plant and on barley embryos. V: Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Close T.J., Bray E.A. (eds.). Rockville, American Society of Plant Physiologist: 119-127

- Bartels D., Schneider K., Terstappen G., Piatkowski D., Salamini F. 1990. Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta*, 181: 27-34
- Bartels D., Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 1: 23-58
- Bartz W., Köster J. 1980. Turnover and degradation of secondary (natural) products. V: *The biochemistry of plants*. Vol. 7. Conn E. E. (ed.). London, Academic Press: 35-84
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1998. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biology*, 239: 70-76
- Bourgard F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851
- Bors W., Heller W., Michel C., Stettmaier K. 1996. Flavonoids and polyphenols: Chemistry and biology. V: *Handbook of antioxidants*. Cadenas E., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc: 409-466
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13: 199-218
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Buitink J., Leprince O. 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology*, 48: 215-228
- Butkovic V., Klasinc L., Bors W. 2004. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2816-2820
- Clifford M.N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 3: 362-372
- Close T.J. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiology of Plants*, 100: 291-296
- Collett H., Butowt R., Smith J., Farrant J., Illing N. 2003. Photosynthetic genes are differentially transcribed during the dehydration-rehydration cycle in the resurrection plant, *Xerophyta humilis*. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2593-2595
- Creissen G.P., Edwards E.A., Mullineaux P.M. 1994. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. V: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Foyer C.H., Mullineaux P.M. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 343-364

- Cuming A. 1999. LEA proteins. V: Seed proteins. Shewry P.R., Casey R. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 753-780
- Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52: 601-623
- Davies K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. modification of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9902-9907
- Deng X., Hu Z., Wang H., Wen X., Kuang T. 2003. A comparison of photosynthetic apparatus of the detached leaves of resurrection plant *Boea hygrometrica* with its non-tolerant relative *Chirita heterotrichia* in response to dehydration and rehydration. *Plant Science*, 165: 851-861
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Brincioglu M., Rodriguez H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32: 1102-1115
- Dražić G., Mihalivic N., Stevanovic B. 1998. Chlorophyll metabolism in leaves of higher poikilohydric plants *Ramonda serbica* Panč. and *Ramonda nathaliae* Panč. et Petrov. during dehydration and rehydration. *Journal of Plant Physiology*, 154: 379-384
- Farrant J.M. 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, 151: 29-39
- Farrant J.M., Pammenter N.W., Berjak P. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation-tolerant types. *Seed Science Research*, 3: 1-13
- Farrant J.M., Vander Willigen C., Loffel D.A., Bartsch S., Whittaker A. 2003. An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. *Plant, Cell and Environment*, 27, 8: 1275-1286
- Foyer C. H. 1993. Ascorbic acid. V: Antioxidants in higher plants. Alscher R.G., Hess J.L. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 31-58
- Frank W. 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell*, 12: 111-123
- Franko M. 2010. Študij sušnega stresa pri rastlinah družine *Gesneriaceae* na ravni proteoma. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 56-61
- Ghoulam C., Foursy A., Fares K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 39-50

- Gilbert G.A., Gadush M.V., Wilson C., Madore M.A. 1998. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, 49: 107-114
- Görg A., Obermaier C., Bought G., Weiss W. 1999. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, 20: 712-717
- Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*, 388:151-157
- Grassmann J., Hippeli S., Elstner E.F. 2002. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 471-478
- Grunwald C. 1974. Sterol molecular modifications influencing membrane permeability. *Plant Physiology*, 54: 624-628
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford, Oxford University Press: 704 str.
- Hara M., Fujinaga M., Kuboi T. 2004. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 657-662
- Harborne J.B. 1999. Classes and functions of secondary products. V: Chemicals from plants. Perspectives on secondary plant products. Walton W.J., Brown D.E. (eds.). London, Imperial College Press: 1-25
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and adiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 3, 11: 298-300
- Hartmann T. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831-2846
- Hartzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hangerman A.E. 2002. Detremination of hidrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) alter reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7: 1785-1790
- Hawkins C.L., Morgan P.E., Devies J.M. 2009. Quantification of protein modifications by oxidants. *Free radical Biology and Medicine*, 46, 8: 965-988
- Hernández L.E., Cooke D.T. 1997. Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1375-1381

- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flangan J.A., Deemer E.K. 2002. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7: 1815-1821
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6: 1841-1856
- Huges D.W., Galau G.A. 1989. Temporally modular gene expression during cotyledon development. *Genes and Development*, 3: 358-369
- Illing N., Denby K.J., Collett H., Shen A., Farrant J.M. 2005. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 771-787
- Ingram J., Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403
- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29: 1297-1301
- Jakubowski W., Bilinski T., Bartosz G. 1999. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 5: 659-664
- Janero D.R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 6: 515-540
- Jazwinski S.M. 1990. An experimental system for the molecular analysis of the aging process: the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Gerontology*, 3, 45: B68- B74
- Jovanovic Z., Rakic T., Stevanovic B., Radovic S. 2011. Characterization of oxidative and antioxidative events during dehydration and rehydration of resurrection plant. *Plant Growth Regulation*, 64, 3: 231-240
- Karadag A., Ozcelik B., Saner S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41-60
- Kim S., Villeponteau B., Jazwinski S.M. 1996. Effect of replicative age on transcriptional silencing near telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 219: 370-376

- Király Z. 2000. New aspects of breeding crops for disease resistance: the role of antioxidants. V: Use of agriculturally important genes in biotechnology. Hrazdina G. (ed.). Budapest, IOS Press: 124-159
- Kosanin N. 1921. La distribution géographique des deux espèces de *Ramondia* du Balkan. Academie des Sceinces et Arts de Belgrade, 34-49
- Krygier K., Sosulski F., Hoegge L. 1982. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 7: 1785-1790
- Laguere M., Lecomte J., Villeneuve P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in Lipid Reasearch, 46: 244-282
- Low P. 1985. Molecular basis of the biological compatibility of nature`s osmolytes. V: Transport processes. Iono- and osmoregulation. Gilles R., Gilles-Baillien M. (eds.). New York, Springer-Verlag: 469-477
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M. L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 2046-2056
- Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. 2008 Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. Analytica Chimica Acta, 631, 1: 1-19
- Milone M.T.A., Loggini B., Izzo R., Murelli C., Marinone-Albini F., Navarri-Izzo F. 1999. Effects of water deficit and propagation techniques on solute accumulation of *Actinidia deliciosa* (cv. Hayward) vines. Phyton, 39: 37-48
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 84: 407-412
- Moore J.P., Farrant J.M., Lindsey G.G., Brandt W.F. 2005b. The South African and Namibian populations of resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius* are genetically distinct and display variation in their galloylquinic acid composition. Journal of Chemical Ecology, 31,12:2823-2834
- Moore J.P., Westall K.L., Ravenscroft N., Farrant J.M., Lindsey G.G., Brandt W.F. 2005a. The predominant polyphenol in the leaves of resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. Biochemical Journal, 385: 301-308
- Moore J.P., Tuan Le N., Brandt W.F., Driouich A., Farrant J. M. 2008. Towards system-based unerstanding of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Science, 14, 2: 110-117

- Mužerlin A. 2009. Vpliv pomanjkanja vode na proteolitično aktivnost v listih ramonde in afriške vijolice. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 82 str.
- Naczk M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111
- Navari-Izzo F., Raisco N. 1999. Plant response to water deficit conditions. V: *Handbook of plant and crop stress*. Pessarakli M. (ed.). New York, Dekker Inc.: 231-270
- NCBI. 2011. PubChem Compound. Bethesda, NCBI: National Center for Biotechnology Information: 1 str.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> (september 2011)
- Nelson D.L., Cox M.M. 2004. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York, W.H. Freeman: 1100 str.
- Niki E. 2010. Assesment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49: 503-515
- Niki E. 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Medicine and Biology*, 47: 469-484
- Niki E. 2008. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors*, 34, 2: 171-180
- Niki E., Noguchi N. 2004. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Accounts of Chemical Research*, 37: 45-51
- Nilsen E.T., Orcutt D.M. 1996. *The physiology of plants under stress. Abiotic factors*. Hoboken, John Wiley and Sons, Inc.: 704 str.
- Norwood M., Truesdale M.R., Richter A., Scott P. 2000. Photosynthetic carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Journal of Experimental Botany*, 51, 343: 159-165
- O` Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 10, 25: 4007-4021
- Ohshima H., Pignatelli P., Li C.Q., Baflist S., Gilbert I., Boffetta P. 2002. Analysis of oxidized and nitrated proteins in plasma and tissues as biomarkers for exposure to reactive oxygen and nitrogen spieces. *IARC Science Publications*, 156: 393-394
- Oliver M.J., Tuba Z., Mishler B.D. 2000. The evolution of vegetative desoccation tolerance in land plants. *Plant Ecology*, 151: 85-100

- Oliver M.J., Velten J., Mishler D. 2005. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 788-799
- Ortega-Villasante C., Rellán-Alvarez R., Campo F.F., Carpena-Ruiz R.O., Hernandez L.E. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 56, 418: 2239-2251
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4619-4626
- Payne G.F., Bringi V., Prince C., Shuler M.L. 1991. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture. V: Plant cell and tissue culture in liquid systems. Payne G.F., Bringi V., Prince C., Shuler M.L. (eds.). Munich, Hanser: 1-10
- Peach K. 1950. *Biochemie und physiologie der sekundären pflanzenstoffe*. Berlin, Springer: 268 str.
- Porembski S., Barthlott W. 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology*, 151: 19-28
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53,8: 3101-3113
- Priteo-Dapena P., Castaño R., Almoguera C., Jordano J. 2008. The etopic overexpression of seed-specific transcription factor, HaHSFA9, confers tolerance to severe dehydration in vegetative organ. *Plant Journal*, 54: 1004-1014
- Quartacci M.F., Glisic O., Stevanovic B., Navari-Izzo F. 2002. Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany*, 53, 378: 2159-2166
- Rabbani N., Thornalley P.J. 2009. Quantification of markers of protein damage by glycation, oxidation, and nitration in peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis International*, 29, Suppl. 2: S51-S56
- Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110: 125-136
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Ynag M., Rice-Evans C. 1993. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237

- Reznik M. 1960. Vergleichende biochemie der phenylpropane. *Ergebnisse der Biologie*, 23: 14-46
- Rich P.R., Bonner W.D.J.Jr. 1987. The site of superoxide generation in higher plant mitochondria. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 188: 206-213
- Rinne P.L., Kaikuranta P.L., van der Plas L.H., van der Schoot C. 1999. Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta*, 209: 377-388
- Roberts J.K., DeSimone N.A., Linge W.L., Dure L. 1993. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell*, 5: 769-780
- Rodriguez C.E., Shinyashiki M., Froines J., Yu R.C., Fukuto J.M., Cho A.K. 2004. An examination of quinone toxicity using yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology*, 201, 1-3: 185-196
- Röhrig H., Schmidt J., Colby T., Bräutigam A., Hufnagel P., Bartles D. 2006. Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant Cell Environment*, 29: 1606-1617
- Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177: 67-80
- Sgherri C., Stevanović B., Navari-Izzo F. 2004. Role of Phenolics an the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum*, 122: 478-485
- Shi H., Noguchi N., Niki E. 2001. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in Enzymology*, 335: 157-166
- Siljak-Yakovlev S., Stevanović V., Tomasević M., Brown S.C., Stevanović B. 2008. Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: Cytogeography of living fossils. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 101-112
- Singleton V.L., Rossi J.A.Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal for Enology and Viticulture*, 16, 3: 144-158
- Sitte N., Saretzki G., von Zglinicki T. 1998. Accelerated telomere shortening in fibroblast after extended periods of confluency. *Free Radical Biology and Medicine*, 24: 855-893

- Stevanović B., Pham Thi A.T., Monteiro de Paula F., Veira da Silva J. 1992. Effects of dehydration and rehydration on the polar lipid and fatty acid composition of *Ramonda* species. *Canadian Journal of Botany*, 70: 107-113
- Stevanović B., Janković M.M. 2001. Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka. Beograd, NNK Internacional: 232 str.
- Stevanović V., Niketić M., Stevanović B. 1991. Chorological differentiation of endemorelic species *Ramonda serbica* Panč. and *R. nathaliae* Panč. and Petrov. (*Gesneriaceae*) on the Balkan peninsula. *Botanika Chronika*, 10: 507-515
- Toldi O., Tuba Z., Scott P. 2009. Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science*, 176: 187-199
- Tsuchiya J., Yamada T., Niki E., Kamiya Y. 1985. Interaction of galvinoxyl with ascorbic acid, cysteine, and glutathione in homogeneous solution and in aqueous dispersions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 58: 326-330
- Veljović-Jovanović S., Kukavica B., Stevanović B., Navari-Izzo F. 2006. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 8: 1759-1768
- Veljović-Jovanović S., Noctor G., Foyer C.H. 2002. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 501-507
- Vermerris W., Nicholson R. 2008. Phenolic compound biochemistry. New York, Springer: 276 str.
- Voss P., Siems W. 2006. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radical Research*, 40, 12: 1339-1349
- Werner-Washburne M., Braun E.L., Crawford M.E., Peck V.M. 1996. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 19, 6: 1159-1166
- Wise M.J., Tunnacliffe A. 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 9: 13-17
- Yamamoto Y., Yamashita S. 1997. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as marker of oxidative stress. *Analytical Biochemistry*, 250: 66-73
- Yamasaki H., Heshiki R., Ikehara N. 1995. Leaf-goldening induced by high light in *Ficus microcarpa* L. f., a tropical fig. *Journal of Plant Research*, 108: 171-180

- Yamasaki H., Takahashi S., Heshiki R. 1999. The tropical fig *Ficus microcarpa* L.f. cv. Golden Leaves lacks heat-stable dehydroascorbate reductase activity. *Plant Cell Physiology*, 40: 640-646
- Zakrajšek T., Raspor P., Jamnik P. 2011. *Sacharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism – characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*, 351, 1959: 261-311
- Živković T., Quartacci M. F., Stevanovic B., Marinone F., Navari-Izzo F. 2005. Low-molecular weight substances in the psikilohydric plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Plant Science*, 168: 105-111

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici doc. dr. Poloni Jamnik. Hvala vam za vso pomoč, zavzetnost in predvsem trud, ki ste ga vložili vame in to diplomsko delo. Vaš pozitiven odnos do študentov in osebja v vašem laboratoriju je občudovanja vreden, zato mi je bilo v velik užitek sodelovati z vami.

Zahvaljujem se somentorici dr. Marjetki Kidrič za ves trud in energijo, ki ste ju vložili med nastajanjem moje diplomske naloge. Vaši nasveti mi bodo gotovo koristili na moji nadaljnji raziskovalni poti.

Hvala recenzentu dr. Blažu Cigiću za pregled diplomskega dela ter vso pomoč na znanstvenih področjih, ki so mi nekoliko oddaljena.

Vsem trem bi se posebno zahvalila za izjemno prilagodljivost in razumevanje. Hvala, ker ste mi omogočili pravočasno zaključiti diplomsko nalogo.

Hvala delovni mentorici Teji Zakrajšek ter Katji Istenič za vso pomoč v laboratoriju in odgovore na moja nešteta vprašanja. V veselje mi je bilo delati z vama.

Hvala dr. Tomažu Polaku za pomoč pri analizi polifenolnih profilov.

Hvala dr. Rogerju Painu za lektoriranje angleškega povzetka.

Hvala tudi ostalim zaposlenim na katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil za prijaznost in pomoč.

Hvala Katji za hitro tiskanje in vezavo diplomske naloge.

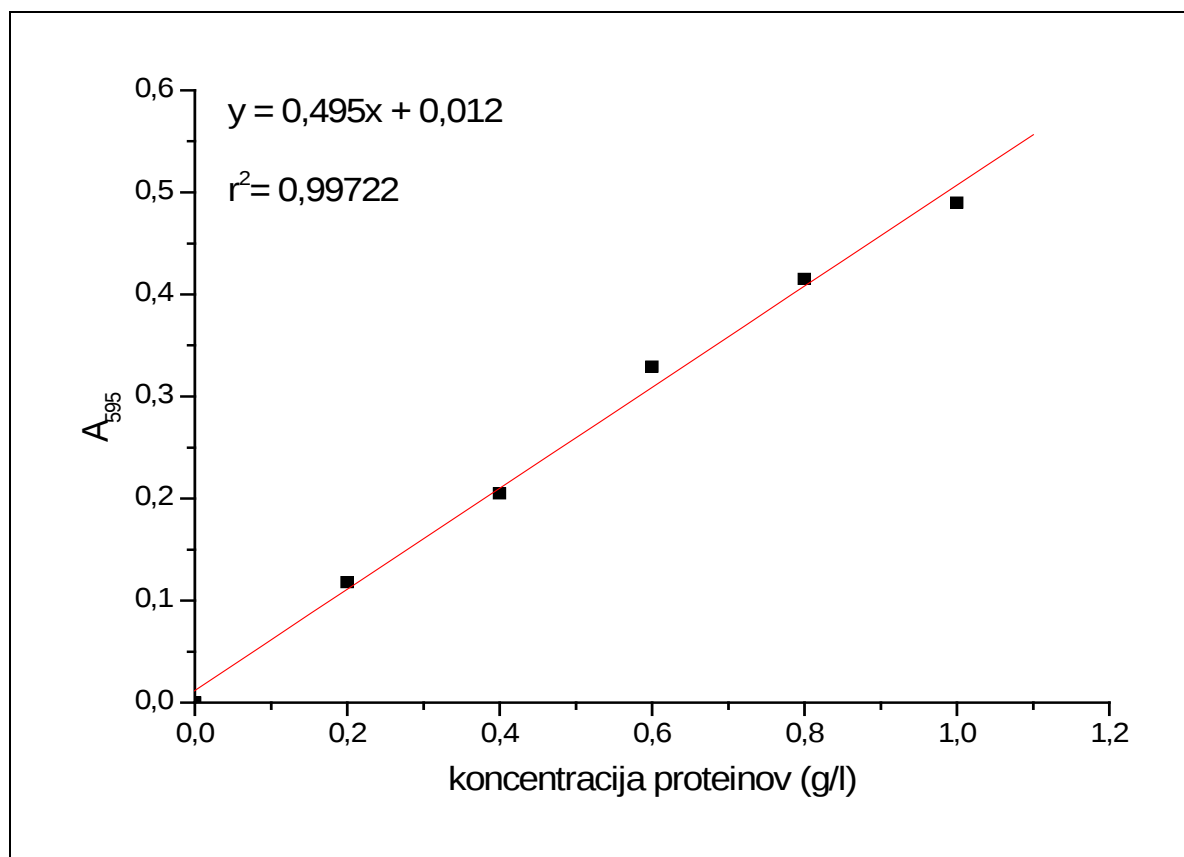
Zahvala gre seveda tudi staršem in sestri. Boljše podpore z vaše strani si ne bi mogla predstavljati.

Hvala sošolkam, prijateljicam, za vso pomoč in prijetna druženja tekom študija. Zaradi vas mi je bilo opravljati študij v veliko veselje.

Posebna zahvala tudi prijateljem, ker mi popestrite marsikateri dan. Z vami je vse lažje.

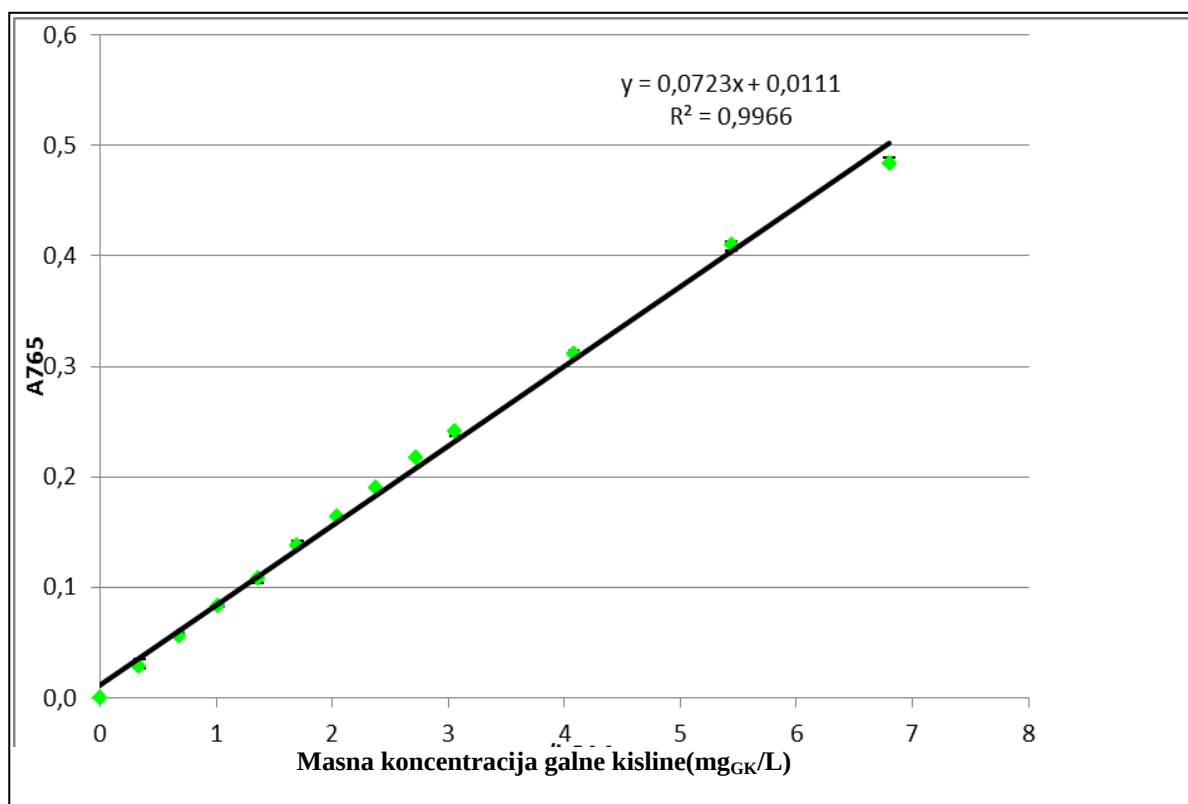
PRILOGE

Priloga A:



Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu po Bradfordovi

Priloga B:



Umeritvena krivulja za določanje celokupne vsebnosti fenolnih spojin izražene kot koncentracija galne kisline (GK) v izvlečku

POPRAVKI