

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Špela ZOBEC

**ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE PRIPRAVKOV
NA OSNOVI EKSTRAKTA LESA BELE JELKE
(*Abies alba*) V CELIČNI KULTURI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Špela ZOBEC

**ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE PRIPRAVKOV NA OSNOVI
EKSTRAKTA LESA BELE JELKE (*Abies alba*) V CELIČNI
KULTURI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**ANTIOXODATIVE ACTIVITY OF COMPOUNDS BASED ON WOOD
EXTRACT OF THE SILVER FIR (*Abies alba*) IN CELL CULTURE**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Polono Jamnik, za somentorja prof. dr. Samota Krefta in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr.

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

Član: prof. dr. Samo KREFT
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 582.475.7:604.4:678.0 (043.2)
- KG *abies alba*, jelka, antioksidativno delovanje, kvasovka, *Saccharomyces cerevisiae*
- AV ZOBEC, Špela
- SA JAMNIK, Polona (mentor), KREFT, Samo (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Magistrski študijski program 2. stopnje Biotehnologija
- LI 2018
- IN ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE PRIPRAVKOV NA OSNOVI LESA BELE JELKE (*Abies alba*) V CELIČNI KULTURI
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
- OP XII, 47, [8] str., 7 pregl., 9 sl., 2 pril., 107 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Oksidativni stres je dokazano povezan s številnimi boleznimi človeka in sodeluje pri procesu staranja. Zadnje čase se zato vedno bolj preučuje delovanje antioksidantov. V sklopu magistrske naloge smo preučevali antioksidativno učinkovitost dveh komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke in standardnih antioksidantov: askorbinske kisline, resveratrola in epigalokatehin-3-galata, 2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluena in *D-α*-tokoferol sukcinata pri dveh različnih koncentracijah (0,05 in 0,1 g suhega ekstrakta oz. učinkovine/L) z uporabo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* kot modelnega organizma. Antioksidativno učinkovitost antioksidantov smo preverili z merjenjem znotrajcelične oksidacije. Dokazali smo, da komercialna priprava lesa in standardni antioksidant EG, raztopljeni v vodi, statistično značilno znižajo znotrajcelično oksidacijo kvasovke, kjer je bilo največje znižanje znotrajcelične oksidacije glede na vrednost opaženo pri EG, in sicer pri koncentraciji 0,1 g/L. V celicah kvasovke, ki so bile izpostavljene etanolnim raztopinam komercialnih pripravkov lesa v preučevanih koncentracijah ni prišlo do znižanja znotrajcelične oksidacije kvasovke. Z metodo štetja kolonij na ploščah smo preverili zaščitno vlogo predtretiranja celic kvasovk z vodnimi raztopinami komercialnih pripravkov lesa in EG v koncentraciji 0,1 g/L pred oksidativnim stresom, ki smo ga inducirali z dodatkom vodikovega peroksida. Predtretiranje celic z EG je statistično značilno povečalo kultivabilnost glede na kulturo, ki ni bila predtretirana kot tudi v primerjavi s predtretiranjem celic s pripravkom lesa, ki pa v preučevani koncentraciji nista pokazala zaščitne vloge pred induciranim oksidativnim stresom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 582.475.7:604.4:678.0 (043.2)
- CX *abies alba*, silver fir, antioxidative activity, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*
- AU ZOBEC, Špela
- AA JAMNIK, Polona (supervisor), KREFT, Samo (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology
- PY 2018
- TI ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF COMPUNDS ON WOOD EXTRACT OF THE SILVER FIR (*Abies alba*) IN CELL CULTURE
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO XII, 47, [8] p., 7 tab., 9 fig., 2 ann., 107 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Oxidative stress is connected with many human diseases and also contributes to the aging process. There are many studies investigating different antioxidants and their activity. The aim of the M.sc thesis was to determine antioxidative activity of the commercial preparations from the silver fir wood extract and standard antioxidants like: ascorbic acid, resveratrol, epigallocatechin gallate (EG), butylated hydroxytoluene (BHT), and D- α -tocopherol succinate in two different concentrations (0.05 in 0.1 g dry extract or compound/L) using yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. The antioxidative activity was determined by measuring intracellular oxidation. It was determined that both commercial wood preparations and EG dissolved in water, decreased the level of yeast intracellular oxidation, where the highest decrease was observed at EG in concentration of 0.1 g/L. Ethanolic extracts of commercial wood preparations at defined concentrations did not decrease the level of oxidation in the cells. Additionally, by measuring culturability we investigated the role of pretreatment of the yeast cells with water extracts of commercial preparations and EG (0.1 g/L) in the protection of cells against oxidative stress induced with hydrogen peroxide. Culturability of yeast cells pre-treated with EG was higher compared to the non-treated cells as well as to commercial wood preparations, which did not show any protective role against induced oxidative stress at defined concentration.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE.....	V
	KAZALO SLIK.....	VIII
	KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
	KAZALO PRILOG	X
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1	UVOD	1
1.1	CILJI NALOGE	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	OKSIDATIVNI STRES	3
2.2	REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI	3
2.3	POŠKODBE CELIČNIH KOMPONENT	5
2.4	ENDOGENI in EKSOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM	6
2.4.1	Resveratrol	7
2.4.2	Askorbinska kislina	9
2.4.3	Epigalokatehin-3-galat.....	10
2.4.4	2,6-diterciarni butil-<i>p</i>-hidroksi toluen (BHT).....	11
2.4.5	D-α-tokoferol sukcinat	12
2.5	BELA JELKA KOT VIR ANTIOKSIDANTOV.....	13
2.5.1	Lubje bele jelke.....	14
2.6	KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM.....	14
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	SHEMA POTEK DELA.....	16
3.2	MATERIALI	17
3.2.1	Mikroorganizem	17
3.2.2	Komercialni pripravki na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (<i>Abies alba</i>) in standardni antioksidanti	17

3.2.3	Gojišča	17
3.2.4	Raztopine in reagenti	18
3.3	LABORATORIJSKE APARATURE, NAPRAVE IN PRIBOR	20
3.3.1	Priprava založnih raztopin ekstraktov lesa bele jelke in petih standardnih antioksidantov (ASK, RS, TK, BHT, EG)	20
3.3.2	Priprava gojišč, raztopin, reagentov	21
3.3.3	Kultivacija in inkubacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	21
3.3.4	Merjenje znotrajcelične oksidacije	21
3.3.5	Merjenje celične metabolne energije	22
3.3.6	Hladilniki, zmrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev	22
3.4	METODE	22
3.4.1	Priprava založnih raztopin komercialnih pripravkov na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (<i>Abies alba</i>) in standardnih antioksidantov	22
3.4.2	Kultivacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	23
3.4.3	Izpostavitve celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> komercialnim pripravkom na osnovi ekstrakta lesa bele jelke in standardnim antioksidantom	23
3.4.4	Določanje znotrajcelične oksidacije	23
3.4.5	Določanje metabolne aktivnosti celic	24
3.4.6	Določanje živosti kvasovk	25
3.4.7	Statistična analiza rezultatov	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1	PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI PREUČEVANIH SNOVI RAZTOPLJENIH V RAZLIČNIH TOPILIH (voda in 96 % etanol)	27
4.1.1	Preverjanje antioksidativne učinkovitosti vodnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) in standardnih antioksidantov (ASK, EG)	27
4.1.2	Preverjanje celične metabolne aktivnosti vodnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) in EG	31
4.1.3	Preverjanje antioksidativne učinkovitosti etanolnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) in standardnih antioksidantov (TK, BHT in RS)	31
4.2	PREVERJANJE VLOGE PREDTRETIRANJA CELIC Z ANTIOKSIDANTI PRED OKSIDATIVNIM STRESOM Z MERJENJEM CELIČNE KULTIVABILNOSTI	34
5	SKLEPI	36
6	POVZETEK	37

7	VIRI	39
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska strukturna formula <i>cis</i> (levo) in <i>trans</i> -resveratrola (levo) (Rege in sod., 2014)	8
Slika 2: Kemijska strukturna formula L-askorbinske kisline (levo) in L-dehidroaskorbinske kisline (desno) (Abadi in sod., 2003)	9
Slika 3: Kemijska strukturna formula epigalokatehin-3-galat (EGCG) (Davinelli in sod., 2012)	10
Slika 4: Kemijska strukturna formula BHA (levo) in BHT (desno) (Sathiyamoorthi in Sankaranarayanan, 2016)	12
Slika 5: Kemijska strukturna formula naravnih izooblik vitamina E, tokoferol (zgoraj) in tokotrienol (spodaj) (Neophytou in Constantinou, 2015)	13
Slika 6: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela	16
Slika 7: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi komercialnim pripravkom iz ekstrakta lesa bele jelke	28
Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi komercialnim pripravkom iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna pripravka B in P) v etanolu in standardnim antioksidantom	32
Slika 9: Določanje kultivabilnosti celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi komercialnim pripravkom iz ekstrakta lesa bele jelke	34

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD	17
Preglednica 2: Sestava tekočega gojišča YEPD	18
Preglednica 3: Sestava pufra PBS	19
Preglednica 4: Sestava 50 mM KH ₂ PO ₄	19
Preglednica 5: Sestava 50 Mm K ₂ HPO ₄	19
Preglednica 6: Priprava 1 mM založne raztopine 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (H ₂ DCFDA)	20
Preglednica 7: Priprava založnih raztopin komercialnih pripravkov na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (<i>Abies alba</i>) in standardnih antioksidantov	22

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi komercialnim pripravkom in standardnim antioksidantom v vodi in etanolu

PRILOGA B: Preverjanje kultivabilnosti kvasnih celic

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
O ₂ ^{•-}	superoksidni anion
•OH	hidroksilni radikal
ROO•	peroksilni radikal
HOO•	hidroperoksilni radikal
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
CoQ	koencim Q
MDA	malondialdehid
HNE	hidroksi nonenal
GSH	reducirana oblika glutationa
FDA	Zvezna uprava za hrano in zdravila Združenih držav Amerike (ang. <i>Food and Drugs Administration</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani
YEPD	gojišče s kvasnim ekstraktom, peptonom in dekstrozo
CFU	število kolonijskih enot (ang. <i>colony forming units</i>)
ddH ₂ O	bidestilirana voda
dH ₂ O	destilirana voda
H ₂ DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
OD	optična gostota
OD ₆₅₀	optična gostota pri 650 nm
H ₂ DCF	2',7'-dihidrodiklorofluorescein
DCF	diklorofluorescein
PFI	prirast fluorescenčne intenzitete
RPFI	relativni prirast fluorescenčne intenzitete
L	luminiscenca

RL	relativna luminiscenca
SD	standardni odklon
w/v	g/100 mL
v/v	mL/100 mL

1 UVOD

Vključitev kisika v Zemljino atmosfero lahko opišemo kot »dvorezni meč«. Kisik je po eni strani zagotovil in omogočil evolucijski razvoj kompleksnim organizmom, hkrati pa je postal vir toksičnih spojin. Evkarionti so tako morali poleg razvoja sposobnosti izkoriščanja kisika zgraditi še obrambo proti toksičnim učinkom kisika (Abele, 2002). Kisik že od samega začetka velja za nekakšnega povzročitelja težav. Kljub temu, da je po naravi bolj počasen reaktant, ima visoko tendenco tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (angl. *reactive oxygen species*, ROS). ROS lahko znotraj celice povzročijo genetsko degeneracijo in fiziološke disfunkcije, ki vodijo v celično smrt in progresivno staranje organizma (Abele, 2002). Živi organizmi imajo zelo dobro razvite sisteme za vzdrževanje uravnovežene koncentracije ROS (Lushchak, 2014). Antioksidativni obrambni sistemi so pomembni za preprečevanje oksidativnih poškodb v celicah in zaščito celic pred oksidativnim stresom. Antioksidante delimo na endogene in eksogene. Prve celica sintetizira sama, med njih spadajo encimski in neencimski antioksidanti. Druge dobimo z živili ali s prehranskimi dopolnili. V nalogi smo uporabili dva komercialna pripravka iz lesa bele jelke in primerjali njuno antioksidativno delovanje s petimi že znanimi antioksidanti na trgu (resveratrol, askorbinska kislina, epigalokatehin-3-galat, 2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluen, D- α -tokoferol sukcinat). Oba komercialna pripravka iz lesa bele jelke sta bila v naši raziskavi prvič preučevana na celični ravni.

1.1 CILJI NALOGE

1. Preveriti antioksidativno delovanje komercialnih pripravkov na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (*Abies alba*) v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti kot modelnem organizmu.
2. Primerjati antioksidativno delovanje komercialnih pripravkov ekstrakta lesa bele jelke z že uveljavljenimi standardnimi antioksidanti.
3. Preveriti vlogo predtretiranja celic s prej omenjenimi antioksidanti pred oksidativnim stresom z merjenjem celične kultivabilnosti.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

1. Predvidevamo, da bo izpostavitvev kvasovke *S. cerevisiae* komercialnim pripravkom na osnovi ekstrakta lesa bele jelke znižala znotrajcelično oksidacijo.
2. Predvidevamo, da bo znižanje znotrajcelične oksidacije po izpostavitvi celic komercialnim pripravkom na osnovi ekstrakta lesa bele jelke v primerjavi s standardnimi antioksidanti večje.
3. Predvidevamo, da bo kultivabilnost predtretiranih celic s komercialnima pripravkoma ekstrakta lesa bele jelke po izpostavitvi oksidativnemu stresu v primerjavi s standardnimi antioksidanti večja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDATIVNI STRES

O oksidativnem stresu govorimo, ko pride do prevelike tvorbe ROS in/ali zmanjšanja učinkovitosti celičnih antioksidativnih obrambnih sistemov. Oksidativni stres je rezultat metabolnih reakcij, ki porabljajo kisik in predstavlja motnje v ravnotežnem stanju prooksidativnih/antioksidativnih reakcij v živih organizmih. Povečana koncentracija ROS lahko poškoduje celične lipide, proteine ali DNA. Oksidativni stres je dokazano povezan s številnimi boleznimi človeka in sodeluje pri procesu staranja. Ravnotežje med škodljivimi in koristnimi vplivi prostih radikalov je izjemno pomembno za žive organizme (Dröge, 2002; Lushchak, 2014).

Poznamo različne posledice oksidativnega stresa (Halliwell in Gutteridge, 2015):

- Povečana proliferacija celic,
- Prilagoditev celic ali organizma z močnejšim obrambnim sistemom,
- Celične poškodbe, do katerih pride na nekaterih ali vseh molekularnih tarčah, kot so lipidi, DNA, proteini, ogljikovi hidrati,
- Senescenca: celice preživijo, vendar se ne delijo več,
- Celična smrt. Oksidativni stres lahko povzroči poškodbe, kar še posebej velja za poškodbe na DNA, ki lahko sprožijo apoptozo, nekrozo itd.

Rezultati motenega ravnovesja med nastajanjem in odstranjevanjem ROS lahko vplivajo prav na vse celične procese. Posledice zvišanja koncentracije ROS so odvisne od stopnje in mesta nastanka le teh, učinkovitosti antioksidativnih sistemov ter razpoložljivosti energetskih virov in mobilnih celičnih tarč, s katerimi pride do interakcij. Znanih je več razlogov, zakaj lahko pride do motenj na nivoju ROS (Lushchak, 2014):

- Zvišana raven endogenih in eksogenih spojin, ki vstopajo v avtooksidacijo, pri čemer nastanejo ROS,
- Izčrpanje nizko molekularnih rezerv antioksidantov,
- Inaktivacija antioksidativnih encimov,
- Zmanjšana produkcija antioksidativnih encimov in nizko-molekularnih antioksidantov,
- Kombinacije zgoraj naštetih vzrokov.

2.2 REAKTIVNE KISIŠKOVE ZVRSTI

Proste radikale je prvi opisal Moses Gomberg. Precej časa jih niso šteli kot del biološkega sistema zaradi njihove visoke reaktivnosti in posledično kratke življenjske dobe. Od leta 1950,

ko so odkrili proste radikale v biološkem sistemu, se je naše znanje o prisotnosti prostih radikalov močno razširilo. Leta 1969 sta prve encime z obrambnim mehanizmom proti prostim radikalom, imenovane superoksid dismutaza, opisala McCord in Fridovich (McCord in Fridovich, 1969; Lushchak, 2014). Danes je jasno, da prosti radikali aktivno sodelujejo v raznolikih procesih in se ne uvrščajo več samo med škodljive komponente, ampak tudi aktivne komponente v vsakdanjih procesih v živih organizmih (Lushchak, 2014).

Raziskave na področju prostih radikalov v bioloških sistemih veljajo za ene izmed bolj dinamičnih in zapletenih iz več razlogov (Halliwell in Gutteridge, 2015):

- prosti radikali so nestabilni in visoko reaktivni,
- sodelujejo pri številnih in raznolikih reakcijah,
- njihov nastanek je prostorsko in časovno zapleten v celičnem prostoru in zunajcelično,
- odvisnost prostih radikalov od fiziološkega stanja organizma,
- nepoznavanje tehničnih orodij za zanesljivo oceno njihove koncentracije.

ROS so definirane kot molekule ali molekularni fragmenti, ki vsebujejo en ali več neparnih elektronov v atomskih ali molekularnih orbitalah. Zaradi primanjkljaja elektronov, odgovornih za kemijsko stabilnost, so radikali večinoma kratkoživi in posledično zelo visoko reaktivni (Gomberg, 1900; Pham-Huy in sod., 2008; Halliwell in Gutteridge, 2015). Neparni elektron namreč poviša raven reaktivnosti prostega radikala. Radikali, ki nastanejo iz kisika, predstavljajo najpomembnejšo skupino radikalskih zvrsti, nastalih v živih sistemih (Miller in sod., 1990). V primeru, da se molekularni kisik združi z enim elektronom, nastane superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$). $O_2^{\cdot-}$, ki nastane pri metabolnih procesih ali s sevanjem spada med primarne ROS in ima sposobnost nadaljnje interakcije z molekulami, pri čemer nastanejo sekundarne ROS. Primarne ROS reagirajo s sekundarnimi ROS skozi encimsko ali kovinsko katalizirane reakcije (Valko in sod., 2005). Z dismutacijo $O_2^{\cdot-}$ (spontano ali preko reakcije, ki je katalizirana s superoksid dismutazo) nastane vodikov peroksid (H_2O_2), ki se nadalje lahko s peroksidazami popolnoma reducira do vode (H_2O) ali pa delno reducira do hidroksilnega radikala ($\cdot OH$) ob prisotnosti reduciranih kovin. $\cdot OH$ velja za enega izmed najmočnejših oksidantov v naravi (Liochev in Fridovich, 1999).

H_2O_2 ni prosti radikal in je precej manj reaktiven kot $O_2^{\cdot-}$. Ne glede na to H_2O_2 uvrščamo v skupino ROS, saj je prisoten pri nastanku in detoksifikaciji prostih radikalov. Zaradi svoje nepolarnosti ne more prehajati skozi celico in celične organele in zato pogosto deluje kot sekundarni prenašalec v signalnih transdukcijskih poteh. Nastaja v peroksisomih, le ti so glavno mesto porabe kisika in pa drugih metabolnih aktivnosti, ki potrebujejo kisik za svoje delovanje. Poraba kisika v peroksisomih vodi v nastanek H_2O_2 . Ko so peroksisomi poškodovani se H_2O_2 sprošča v citosol, kjer pa prispeva k oksidativnemu stresu (Valko in sod., 2004). Prav tako med proste radikale uvrščamo različne peroksilne radikale (ROO^{\cdot}). Najbolj preprosta oblika, nastala

iz protonirane oblike $O_2^{\cdot-}$, se imenuje hidroperoksilni radikal (HOO^{\cdot}) (Burton in Jauniaux, 2011; Semchyshyn in sod., 2012; Lushchak, 2014).

Glede na izvor ROS jih delimo na eksogene ali endogene (Trachootham in sod., 2008). Eksogeni vir ROS predstavljajo onesnaževalci, tobak, dim, ksenobiotiki ali sevanje UV svetlobe, rentgenski žarki ter σ -žarki. Endogeni vir ROS v organizmih so mitohondrijska elektronska transportna veriga, endoplazmatski retikulum, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat [NAD(P)H] oksidaze, citokrom C oksidaze, ksantin oksidaze, mikrosomi in peroksisomi. Prav tako k nastanku ROS pripomorejo redoks aktivne kovine, kot sta železo (Fe) in baker (Cu) (Trachootham in sod., 2008; Ye in sod., 2015).

V mnogih aerobnih celicah je mitohondrijska elektronska transportna veriga eden izmed najbolj pomembnih *in vivo* virov nastanka ROS. Največ $O_2^{\cdot-}$ nastane pri prehodu elektronov s koencima Q na molekularni kisik, v nadaljevanju pa spontano ali ob pomoči encima nastaneta $^{\cdot}OH$ in H_2O_2 (Trachootham in sod., 2008; Lushchak, 2014; Ye in sod., 2014).

2.3 POŠKODBE CELIČNIH KOMPONENT

ROS lahko poškodujejo širok spekter celičnih komponent, kar se izrazi s številnimi procesi, kot so: lipidna peroksidacija, oksidacija proteinov in genetske poškodbe, ki nastanejo preko modifikacije DNA (Morano in sod., 2011).

$^{\cdot}OH$ lahko reagira z vsemi komponentami molekule DNA in tako poškoduje purinske in pirimidinske baze ter ogrodje deoksiriboze (Dizdaroglu in sod., 2002). Identificiranih je bilo že več kot 100 produktov, ki so nastali zaradi oksidacije DNA, med njimi prekinitve enojne ali dvojne DNA verige, modifikacije purinov, pirimidinov in deoksiriboze ter povezovanja verig DNA. Mitohondrijska DNA je zaradi bližine dihalne verige in pomanjkanja zaščitnih histonov bolj dovzetna in občutljiva na oksidativne poškodbe kot jedrna DNA (Valko in sod., 2006; Lenaz in sod., 2012; Ott in sod., 2007).

Reaktivne kisikove zvrsti napadajo tudi polinenasičene maščobne kisline. Le-te so izjemno občutljive in dovzetne za oksidacijo. Potek lipidne peroksidacije lahko razdelimo na tri faze: iniciacija, propagacija in terminacija (Valko in sod., 2006). V fazi iniciacije pride do odvzema vodikovega atoma z lipida, kar povzroči nastanek neparnega elektrona na ogljiku, posledično nastane ogljikov radikal. Pri reakciji ogljikovega radikala s kisikom nastanejo peroksilni radikal, ciklični peroksidi in hidroperoksidi. Ker je takrat peroksilni radikal dovolj reaktiven in sposoben ponovno odvzeti vodikov atom iz druge lipidne molekule, le-ta vstopi v nadaljnjo radikalno reakcijo s sosednjim lipidom. Vodikov radikal zaradi svoje nenabitosti veliko lažje vstopi v membrano kot kisikov radikal. Vodikov radikal stimulira peroksidacijo z nastankom lipidnega hidroperoksida. Fazo peroksidacije, kjer ogljikov radikal ponovno reagira z novo molekulo

kisika in kjer v nadaljevanju nastanejo večje količine peroksidnega radikala, imenujemo propagacija ali razmnoževanje. Do zadnje faze, imenovane terminacija, pride, ko se radikal sreča z radikalom ali ko se radikal sreča z antioksidantom in se verižna reakcija konča. Reakcija peroksidnega radikala s kisikom vodi do nastanka endoperoksidov. Končni produkt lipidne peroksidacije so malondialdehidi (MDA) in 4-hidroksi-2-nonenali (HNE) (Negre-Salvayre in sod., 2008).

Pogosta tarča ROS so cisteinski in metioninski ostanki proteinov. Oksidacija cisteinskih ostankov vodi v reverzibilni nastanek disulfidov med proteinsko tiolno skupino in nizko molekularnimi tioli, najbolj pogosto glutationom (GSH). Ker gre za reverzibilne poškodbe, se le-te lahko popravijo z redukcijo z glutationom, glutaredoksinom, tioredoksinom, disulfid izomerazo ali s tiol transferazo (Dalle-Donne in sod., 2003).

2.4 ENDOGENI in EKSOGENI ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEM

Halliwell in Gutteridge (2015) sta antioksidante definirala kot katero koli snov, ki zadrži, prepreči ali odstrani oksidativne poškodbe, nastale na tarčni molekuli. Antioksidanti delujejo na različne načine: kot inhibitorji oksidativnih reakcij prostih radikalov (preventivni oksidanti) z zaviranjem nastanka prostih lipidnih radikalov, kot preprečevalci avtooksidacijskih verižnih reakcij, z lovljenjem radikalov in kot kovinski zaviralci, ki pretvorijo kovinske prooksidante v stabilne produkte (Darmanyan in sod., 1998; Heim in sod., 2002; Min in Boff, 2002; Pokorný, 2007; Kancheva, 2009).

Endogeni antioksidativni sistem lahko razdelimo v encimski in neencimski. Med neencimске endogene antioksidativne obrambne sisteme pri človeku spadajo lipoična kislina, glutation, L-arginin, koencim Q10, melatonin, sečna kislina, bilirubin, transferin itd. (Ratnam in sod., 2006; Valko in sod., 2007; Bitcher in sod., 2010; André in sod., 2010).

Encimski antioksidativni obrambni sistem uravnava celično redoks homeostazo s superoksid dismutazo (angl. *superoxyde dismutase* – SOD), katalazo ali glutation peroksidazo (GPx). SOD je eden izmed najbolj učinkovitih znotrajceličnih encimskih antioksidantov v naravi. Njegova naloga je, da katalizira pretvorbo $O_2^{\cdot -}$ v H_2O_2 in kisik (Rahman, 2007). V človeških celicah in v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* se nahaja v treh oblikah: baker cinkova dismutaza (CuZn-SOD) v citoplazmi (predstavlja devetdeset odstotkov celotne SOD aktivnosti), manganova dismutaza (Mn-SOD) v mitohondriju in zunjacična dismutaza. Vse oblike SOD potrebujejo za svoje delovanje kovinski ion na svojem aktivnem mestu (Landis in Tower, 2005).

Katalaza je esencialen encim v reakciji razgradnje H_2O_2 . V kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* najdemo dva različna tipa katalaz: katalazo A, ki jo kodira gen *cta1*, in katalazo T, kodirano z genom *ctt1*. Katalaza A se nahaja v v peroksisomih aerobne celice in ščiti celice s katalizo

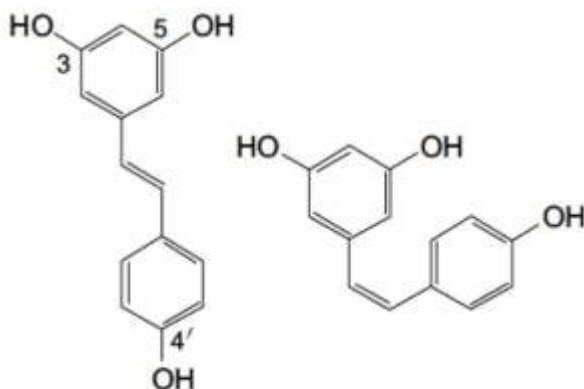
razgradnje H_2O_2 v vodo in molekularni kisik. Katalazo tipa T najdemo v citosolu. Ena sama molekula katalaze lahko v eni minuti pretvori približno šest milijonov molekul vodikovega peroksida v vodo in kisik (Marchler in sod., 1993; Mates in sod., 1999; Valko in sod., 2006).

Glutation peroksidaze se nahajajo v citosolu in mitohondriju in vsebujejo izoencime, kateri katalizirajo redukcijo H_2O_2 in lipidno peroksidacijo tako, da oksidirajo reduciran GSH. Obstajata dva tipa glutacion peroksidaz: selen-neodvisne imenovane tudi glutacion-S-transferaza (GPx 5, 6, 7) in selen-odvisne (GPx1-4). Obliki se razlikujeta v številu podenot, vezavi selena na aktivnem mestu in glede na mehanizem katalize. Za vse velja, da oddajo dva elektrona za redukcijo peroksidov, pri čemer nastanejo selenoli, in pa odstranjujejo perokside kot potencialne substrate za Fentonovo reakcijo. GPx delujejo v povezavi z GSH in sicer medtem ko oksidirajo GSH, ki je v celicah prisoten v visokih koncentracijah, GPx katalizirajo pretvorbo H_2O_2 ali organskega peroksida v vodo ali alkohol (Chaudière in Ferrari-Iliou, 1999; Brigelius-Flohé in Maiorino, 2013).

Za delovanje organizma so nujno potrebni tudi antioksidanti, ki jih v telo lahko vnesemo s hrano ali prehranskimi dopolnili. Eksogeni antioksidanti so pomembni, saj so lahko v pomoč endogenim antioksidantom pri nevtralizaciji oksidativnega stresa. Pomanjkanje antioksidantov v telesu je eden izmed vzrokov za številne kronične in degenerativne bolezni (Willcox in sod., 2004; Donalds, 2004). V naši nalogi smo uporabili pet standardnih antioksidantov (resveratrol, askorbinsko kislino, epigalokatehin-3-galat, 2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluen, D- α -tokoferol sukcinat) in dva komercialna pripravka iz lesa bele jelke, ki bodo v nadaljevanju podrobneje predstavljeni.

2.4.1 Resveratrol

Resveratrol ali 3,5,4'-trihidroksi-*trans*-stilben je ne flavonoidna fenolna spojina, ki je prisotna v številnih višje razvitih rastlinah. Spada v skupino polifenolnih spojin, imenovanih stilbeni. Resveratrol je spojina, ki je topna v maščobah in se pojavlja v dveh prostih oblikah: prosta (*cis* in *trans*) ter glikozilirani obliki (Soleas in sod., 1997). Kljub temu, da sta obe prosti obliki biološko aktivni, velja da ima *trans* izomer veliko večji potencial kot *cis* (Brent in sod., 1996).



Slika 1: Kemijska strukturna formula *cis* (levo) in *trans* (desno)-resveratrola (levo) (Rege in sod., 2014).

Cis in *trans* ter glikozilirana oblika resveratrola nastaneta z biosintezo po fenilpropanoidni poti v vseh višje razvitih rastlinah. Fenilpropanoidna pot je odgovorna za sintezo širokega spektra fenolnih naravnih spojin, kot so flavonoidi, lignini in proantocianidini (Wang in sod., 2010). Sinteza resveratrola je že nekaj let mogoča z gensko spremenjenimi organizmi. Danes je največkrat opisano raziskovalno delo na področju sinteze resveratrola v dveh organizmih, in sicer v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in bakteriji *Escherichia coli* (Afonso in sod., 2014). Resveratrol nastaja kot stranski produkt odgovora rastlin na glivno okužbo, mehanske poškodbe in UV sevanje. Zaradi močnih protimikrobnih aktivnosti ima izjemno pomembno vlogo pri odpornosti rastlin na bolezni (Wang in sod., 2010).

V zadnjih letih se zelo veliko poroča o resveratrolu predvsem zaradi pozitivnih učinkov na človeško telo. Študije so pokazale, da ima resveratrol številne pomembne lastnosti (Wang in sod., 2011):

- protirakavo delovanje,
- protimikrobno delovanje,
- antioksidativno delovanje,
- protivirusno delovanje,
- zaviranje dislipidemije in debelosti,
- zmanjševanje hiperglikemije in hiperinzulinemije,
- zmožnost zaščite endoteljskih funkcij.

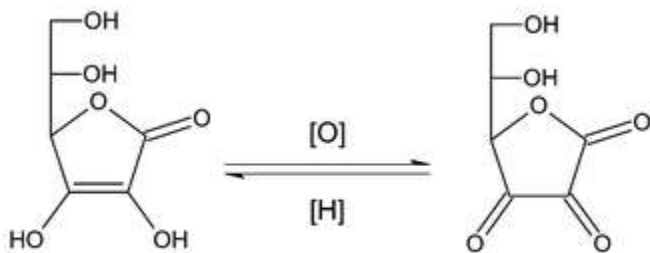
Resveratrol inhibira oksidacijo lipoproteinov nizke gostote (LDL) *in vitro* in potencialno sodeluje pri zaščiti pred boleznimi srca in ožilja z zniževanjem LDL oksidacije *in vivo* (Halliwell in Gutteridge, 2015).

Pretekle raziskave so pokazale antioksidativen učinek preko dveh mehanizmov, in sicer odstranjevanje prostih radikalov in povečanje aktivnosti antioksidativnih encimov (Vitrac in

sod., 2003; Wenzel in Somoza, 2005; Vitaglione in sod., 2005). Spanier in sodelovci so (2009) dokazali, da zaščita, ki jo nudi resveratrol pred oksidativnim poškodbami, nastaja zaradi uravnavanja endogenega celičnega antioksidativnega sistema, ne pa zaradi neposredne aktivnosti lovljenja prostih reaktivnih kisikovih zvrsti, medtem ko so Wang in sodelovci (2012) dokazali, da resveratrol inducira endogene antioksidativne sisteme, kot so superoksid dismutaza, tioredoksin, glutation peroksidaza, hemo oksigenaza-1 in katalaza in zavira nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti z NADPH oksidazami (NOX).

2.4.2 Askorbinska kislina

Askorbinska kislina ali vitamin C se nahaja v telesu v dveh oblikah: L-askorbinska kislina (ASK), ki je močan reducent ali L-dehidroaskorbinska kislina (DHA) v oksidirani obliki. ASK in DHA se v organizmu v encimsko kataliziranih reakcijah oksidacije in redukcije pretvarjata ena v drugo. Reverzibilna sposobnost reakcije med DHA in ASK je ena izmed najbolj pomembnih kemijskih lastnosti askorbinske kisline. Za razliko od ASK, DHA nima antioksidativne sposobnosti (Carr in sod., 2013).



Slika 2: Kemijska strukturna formula L-askorbinske kisline (levo) in L-dehidroaskorbinske kisline (desno) (Abbadi in sod., 2003).

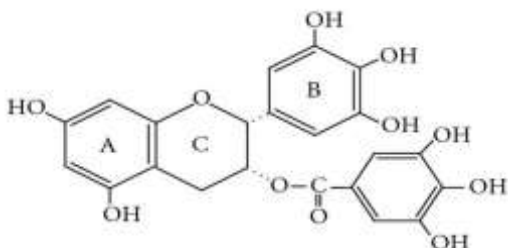
S. cerevisiae ne sintetizira L-askorbinske kisline, po drugi strani pa *S. cerevisiae* in številne druge glive sintetizirajo D-eritroaskorbinsko kislino iz D-arabinoze. D-eritroaskorbinska kislina ima vlogo pri obrambi pred H_2O_2 , saj so mutanti, ki jim manjka zadnji gen v biosintezni poti (alo1), občutljivi na ROS. Povečana izraženost gena alo1 povečuje odpornost na H_2O_2 (Huh in sod., 1998).

Prav tako je ASK posebna zaradi svoje zgradbe, saj vsebuje dve hidroksilni skupini. ASK je v nevtralnem in bazičnem pH-ju v obliki aniona (askorbat). V reakciji radikala in askorbata nastane stabilnejši askorbil radikal. Askorbil se v nadaljevanju pretvori nazaj v askorbat ali pa v neaktivne molekule, ki se izločijo z urinom (Linster in Van Scaftingen, 2007: Du in sod., 2012).

ASK lahko odstrani superoksid in hidroksilne radikale ter regenerira α -tokoferol (Davey in sod., 2000). V sinergistični reakciji z vitaminom E ščiti LDL pred oksidativnimi poškodbami (Frei in sod., 1989; Du in sod., 2012). Deluje tudi kot prooksidant, in sicer zaradi sposobnosti redukcije Fe^{3+} v Fe^{2+} . Fe^{2+} v Fentonovi reakciji pripomore k nastanku hidroksilnega radikala, kar vodi v nadaljnje oksidativne procese. Zadnje raziskave kažejo, da pri previsoki koncentraciji ASK lahko le-ta povzroči prekinitvev DNA, poškoduje tkiva in celo privede do celične smrti v tkivnih kulturah (Halliwell in Gutteridge, 2015).

2.4.3 Epigalokatehin-3-galat

Čaj je po uporabi druga najpogostejša pijača, takoj za vodo. Poleg privlačne arome in dobrega okusa ima čaj dokazane zdravju koristne učinkovine in pozitivne lastnosti, kot so antioksidativno delovanje, protirakavo delovanje in zniževanje krvnega tlaka. Polifenoli, ki jih najdemo v čaju, imajo terapevtske učinke pri kroničnih patoloških stanjih, kot so rak, nevrodegenerativne bolezni, diabetes in kardiovaskularne bolezni. Zeleni čaj vsebuje visoke koncentracije fenolnih spojin, predvsem katehinov: epigalokatehin-galat (EGCG), epikatehin-galat (ECG), epigalokatehin (EGC) in epikatehin (EC) (Balentine in sod., 1997; Ahmad in sod., 2000; Dufresne in Farnworth., 2001; Babu in Liu, 2008).



Slika 3: Kemijska strukturna formula epigalokatehin-3-galata (EGCG) (Davinelli in sod., 2012).

Študije na živalih in ljudeh kažejo, da lahko zeleni čaj in katehini v njem zmanjšajo vsebnost biomarkerjev oksidativnega stresa in lipidne peroksidacije, hkrati pa zvišajo antioksidativno kapaciteto plazme. Katehini lahko stabilizirajo ROS in preprečijo oksidativne poškodbe z direktnim odstranjevanjem prostih radikalov. Odstranjevanje prostih radikalov vključuje delokalizacijo elektronov, nastanek vodikovih vezi, reorganizacijo molekul in kelacijo kovin, ki bi lahko bile prisotne pri oksidaciji. Zaradi števila in postavitve fenolnih hidroksilnih skupin so katehini izvrstni donorji elektronov in učinkoviti odstranjevalci prostih radikalov (Paquay in sod., 2000; Liao in sod., 2001; Khan in Mukhtar, 2007; Babu in Liu, 2008).

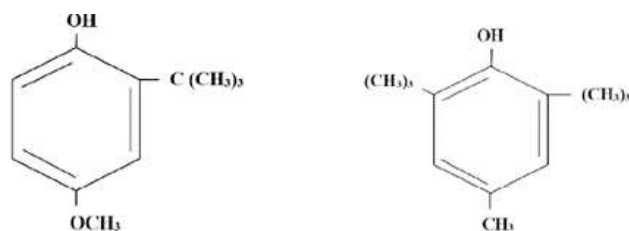
V zelenem čaju ima EGCG med vsemi katehini največji antioksidativni potencial, kar pomeni, da ima ortohidroksilna skupina in 3-galat estri v katehinu izjemno pomembno vlogo pri antioksidativni aktivnosti, odstranjevanju radikalov in preprečevanju oksidativnih poškodb bioloških komponent. Pri študijah v *in vitro* sistemu se je izkazalo, da je antioksidativno delovanje ECG enakovredno antioksidativnemu delovanju EGCG. Glede na klinične raziskave in raziskave na živalih in celičnih kulturah naj bi bil ravno EGCG tisti, ki ima največ pozitivnih učinkov izmed vseh polifenolov v zelenem čaju. Biološka aktivnost EGCG je odvisna od njegove koncentracije (Liao in sod., 2001; Osada in sod., 2001; Babu in Liu, 2008; Chan in sod., 2011).

Lastnosti polifenolov so lahko antioksidativne ali prooksidativne, odvisno od strukture polifenola in celičnega redoks razmerja. Danes se vse več piše tudi o prooksidativnih lastnostih EGCG. V nekaterih raziskavah je bil namreč rezultat tretiranja celic z EGCG v prisotnosti Fe(III) nastanek H₂O₂ in hidroksilnega radikala (Kim in sod., 2014).

EGCG deluje direktno na membrano proteinov in fosfolipidov, ki stimulirajo znotrajcelične signalne poti. EGCG se transportira v citosol, mitohondrij, lizosom in v celično jedro, kjer biološko deluje s svojimi lastnostmi. Kako deluje, je odvisno od celičnega tipa, fiziološkega stanja celice in koncentracije EGCG. Pomembno je, da se zavedamo, da delovanje EGCG *in vitro* ni enako kot *in vivo*. Glavni razlog je, da se EGCG po absorpciji skozi črevesje modificira, kar omeji tudi njegovo dostopnost za nadaljnje procese. Koncentracijo, ki jo dosežemo *in vitro*, je izjemno težko doseči tudi *in vivo* (Kim in sod., 2014).

2.4.4 2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluen (BHT)

3,5-di-tert-butil-4-hidroksi-toluen (BHT) in 3-terciarni butil-4-hidroksi anizol (BHA) sta sintetična fenolna antioksidanta, ki se danes razširjeno uporablja kot aditiva. Fenolni antioksidanti predstavljajo pomembno skupino spojin, ki inhibirajo oksidacijo. Strukturna raznolikost fenolnih antioksidantov igra pomembno vlogo pri fizioloških lastnostih in razlikah v antioksidativni aktivnosti (Fries in Püttman, 2001; Fujisawa in sod., 2004).



Slika 4: Kemijska strukturna formula BHA (levo) in BHT (desno) (Sathiyamoorthi in Sankaranarayanan, 2016).

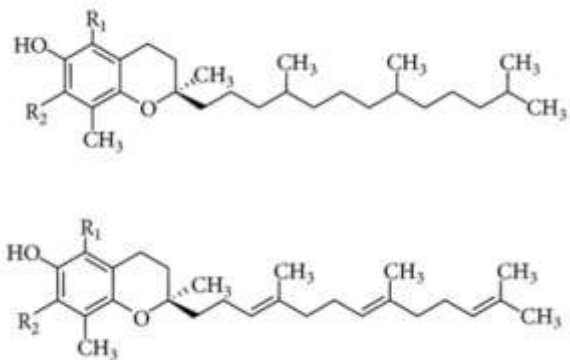
Fenolni antioksidant 3,5-di-tert-butil-4-hidroksi-toluen so patentirali leta 1947. Do danes je napisanih že več kot 15000 publikacij o BHT-ju in njegovih aplikacijah. Največ je napisanega uporabi BHT-ja v prehranski industriji, farmaciji in farmakologiji. Prav tako se uporablja kot dodatek v eteričnih oljih in kozmetiki. Leta 1954 je Zvezna uprava za hrano in zdravila (FDA) v Združenih državah Amerike odobrila uporabo nizkih koncentracij BHT v prehranski industriji. BHT velja za varen dodatek živilom in je eden izmed bolj pogosto uporabljenih antioksidantov v prehrani in naftnih proizvodih (Yehye in sod., 2015). BHA (3-terciarni butil-4-hidroksi anizol) in BHT (2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluen) spadata med fenole, kjer fenolni obroč vsebuje di-terciarno-butil skupino, zaradi katere delujeta obe obliki kot izjemno učinkovit antioksidant. BHA poleg antioksidativne aktivnosti deluje tudi protimikrobno in je prav tako znan kot ko-antioksidant skupaj z BHT ali α -tokoferolom. BHT se množično uporablja v kombinaciji z drugimi antioksidanti, kot so BHA (butil hidroksi anizol), propil galat, v kombinaciji s citronsko kislino za stabilizacijo olj in v živilih z visoko vsebnostjo maščob (Mukhopadhyay, 2006).

Zadnje raziskave so usmerjene predvsem v iskanje novih antioksidantov, ki izpolnjujejo točno določene zahteve in lastnosti s področja živilske tehnologije in farmacije. Za pospešitev postopkov odkrivanja novih antioksidantov so znanstveniki začeli konstruirati in sintetizirati BHT derivate z izboljšanimi antioksidativnimi lastnostmi, širokim spektrom antioksidativne aktivnosti, s povečano sposobnostjo odstranjevanja radikalov in drugimi fizikalnimi lastnostmi. V raziskavah so uporabili BHT kot temeljno molekulo, ki so jo poskušali izboljšati in nadgraditi. Znanstveniki pričakujejo, da je to trend, kamor se bodo pomikale raziskave na področju BHT (Yehye in sod., 2015).

2.4.5 D- α -tokoferol sukcinat

D- α -tokoferol je glavna aktivna oblika vitamina E in zato kar sinonim za vitamin E (Mikuš in Poljšak, 2005). Naravno obliko vitamina E sestavlja osem lipofilnih molekul, ki vključujejo alfa, beta, gama in sigma tokoferol (imajo nasičeno stransko verigo) in alfa, beta, gama in sigma tokotrienol (imajo nenasičeno stransko verigo). Vse oblike vitamina E imajo kromanolni obroč

in 16-ogljiko fitil-podobnih stranskih verig, kjer se tokoferoli nasičijo in kjer imajo tokotrienoli dvojne vezi. Fiziološko najbolj aktivna oblika vitamina E je α -tokoferol. Le-ta je derivat 6-hidroksikromana in metiliran na mestih 2, 5, 7 in 8. (Jiang, 2014).



Slika 5: Kemijska strukturna formula naravnih izooblik vitamina E: tokoferol (zgoraj) in tokotrienol (spodaj) (Neophytou in Constantinou, 2015).

Zaradi podobnih fenolnih delov v spojinah imajo vsi tokoferoli in tokotrienoli potencial antioksidativnega delovanja, in sicer z odstranjevanjem peroksilnih radikalov. Vitamin E preprečuje nastanek verižne reakcije lipidne peroksidacije v celični membrani in nastajanje oksidiranega LDL v plazmi. Peroksilne radikale odstrani tako, da odda vodik iz fenolne skupine na kromanol obroč, pri čemer se tvori tokoferoksilni radikal in lipidni hidroperoksid. Tokoferoksilni radikal je stabilen, nereaktiven, posledično nezmožen nadaljevanja verižne reakcije. V nekaterih raziskavah je bilo izpostavljeno, da so tokotrienoli bolj učinkoviti, kar je posledica bolj enakomerne razporeditve tokotrienolov v fosfolipidnem dvosloju in učinkovitejše interakcije s peroksilnimi radikali (Jiang, 2014).

Z nedavnimi raziskavami, kjer so preučevali vlogo α -tokoferola, so prišli do novih ugotovitev, predvsem o zaščitni vlogi, preprečevanju in zdravljenju kroničnih bolezni ter srčno-žilnih bolezni. Po drugi strani pa so nedavne predklinične raziskave z ostalimi oblikami vitamina E na živalskih modelih razkrile biološke lastnosti, ki lahko koristno vplivajo na terapije kroničnih bolezni. Izkazalo se je, da imajo dolgoverižni metaboliti vitamina E močnejše protivnetne učinke kot predhodne skupine vitamina E (Myung in sod., 2013).

2.5 BELA JELKA KOT VIR ANTIOKSIDANTOV

Bela jelka (*Abies alba* Mill.) je ena izmed najbolj pogostih drevesnih vrst v Srednji Evropi. Najdemo jo na Norveškem in na Balkanu. V zadnjih nekaj letih je prejela izjemno veliko zanimanje raziskovalcev po celem svetu, delno zaradi dolge tradicije in vse večje pomembnosti v okoljevarstvu in gozdnem managementu, predvsem pa zaradi ekonomskih, okoljskih in

socialnih problemov, povezanih z naravno regeneracijo. Med različnimi naravno prisotnimi vrstami jelke v Evropi je bela jelka ekonomsko in ekološko najpomembnejša. Les se večinoma uporablja za gradnjo, pohištvo, vezan les in pridelavo celuloze (Westergren in sod., 2010).

Literatura navaja raziskave, ki so se osredotočile na kemijsko sestavo iglic, vej, smole in stržena bele jelke. Rezultati raziskave ekstrakta bele jelke so potrdili prisotnost monoterpenov, monoterpenoidov v smoli in vejah, triterpenoidov v iglicah in smoli, seskviterpenov v iglicah in smoli, diterpenoidov, steroidov v iglicah in lignanov v strženu. Biološko delovanje izvlečka bele jelke je slabo poznano (Benković Tavčar in sod., 2014). Yang in sodelovci (2008) so pokazali, da so bile tudi ostale vrste rodu *Abies* dokazane kot bogat vir lignanov, flavonoidov in ostalih fenolov z antioksidativno aktivnostjo.

2.5.1 Lubje bele jelke

Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani so leta 2014 izvedli raziskavo, kjer so v ekstraktu lubja bele jelke določili kemijsko sestavo in antioksidativno aktivnost. Antioksidativno aktivnost so merili z dvema metodama, in sicer z DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidazil) metodo in s celičnim testom, kjer so uporabili mononuklearne celice iz človeške periferne krvi. Antioksidativna aktivnost izvlečka bele jelke, določena z metodo DPPH, je bila za 90 % višja v primerjavi z ekstraktom lubja obmorskega bora. Les bele jelke se sicer uporablja za gradnjo in za eterična olja in dišave, medtem ko je lubje ostanek pri predelavi lesa in je lahko ugodni izhodni material pri produkciji aktivnih antioksidativnih ekstraktov. V raziskavi so v ekstraktu lubja bele jelke identificirali naslednje spojine (Benković Tavčar in sod., 2014):

- 6 fenolnih kislin (galna, homovanilna, protokatehuicna, *p*-hidroksibenzoicna, vanilna, *p*-kumarna kislina),
- 3 flavonoide (katehin, epikatehin in katehin tetrametil eter),
- 4 lignane (taksiresinol, 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-5-iloksi)-taksiresinol, sekojsolariciresinol in laricinresinol).

2.6 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM

Modelni organizmi zagotavljajo določene okvire za razvoj in optimizacijo različnih metod, zato se uporabljajo za različne raziskave (Karathia in sod., 2011).

Modelne organizme uporabljamo iz različnih razlogov (Karathia in sod., 2011):

- lahko so v pomoč pri premagovanju etičnih in eksperimentalnih omejitev,
- zagotavljajo okvir, na katerem se razvija in optimizira analitične metode,
- namen modelnih organizmov je, da so reprezentativni višjim organizmom.

Saccharomyces cerevisiae je prvi evkariont, katerega genom je bil sekvenciran v celoti. Je eden izmed najbolj pogosto preučevanih evkariontov. Danes se uspešno uporablja kot učinkovito orodje in modelni organizem za študije kontrole celičnega cikla, popravljanja DNA, staranja, izražanja genov, avtofagije in za študije molekularnih in celičnih poti pri človeških boleznih (Matuo in sod., 2012).

Študije na kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* so pripomogle k boljšemu razumevanju bolezni, kot so sladkorna bolezen tipa 2, dedni rak na debelem črevesu, neurofibromatoza, Werner sindrom ipd. (Botstein in sod., 1997). Kvasovke kot modelni organizem so izjemno pomembno orodje pri odkrivanju novih zdravil in njihovih tarč (Bolotin-Fukuhara in sod., 2010).

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* ima mnoge prednosti: majhen genom (približno 200-krat manjši kot človeški), kratek čas podvajevanja, je enostavna za manipulacijo, gre za enostavno in poceni kultivacijo. Kvasne celice obstajajo v haploidni in diploidni obliki, kar omogoča raziskavo recesivnih mutacij. Le-te so lahko nevidne/težko opazne v diploidni obliki divjega tipa (Perego in sod., 2000). Približno 30 % znanih genov, vpletenih pri razvoju človeških bolezni, ima svoje ortologe v kvasovkah in več sto genov pri kvasovkah predstavlja povezavo s človeškimi boleznimi (Karathia in sod., 2011).

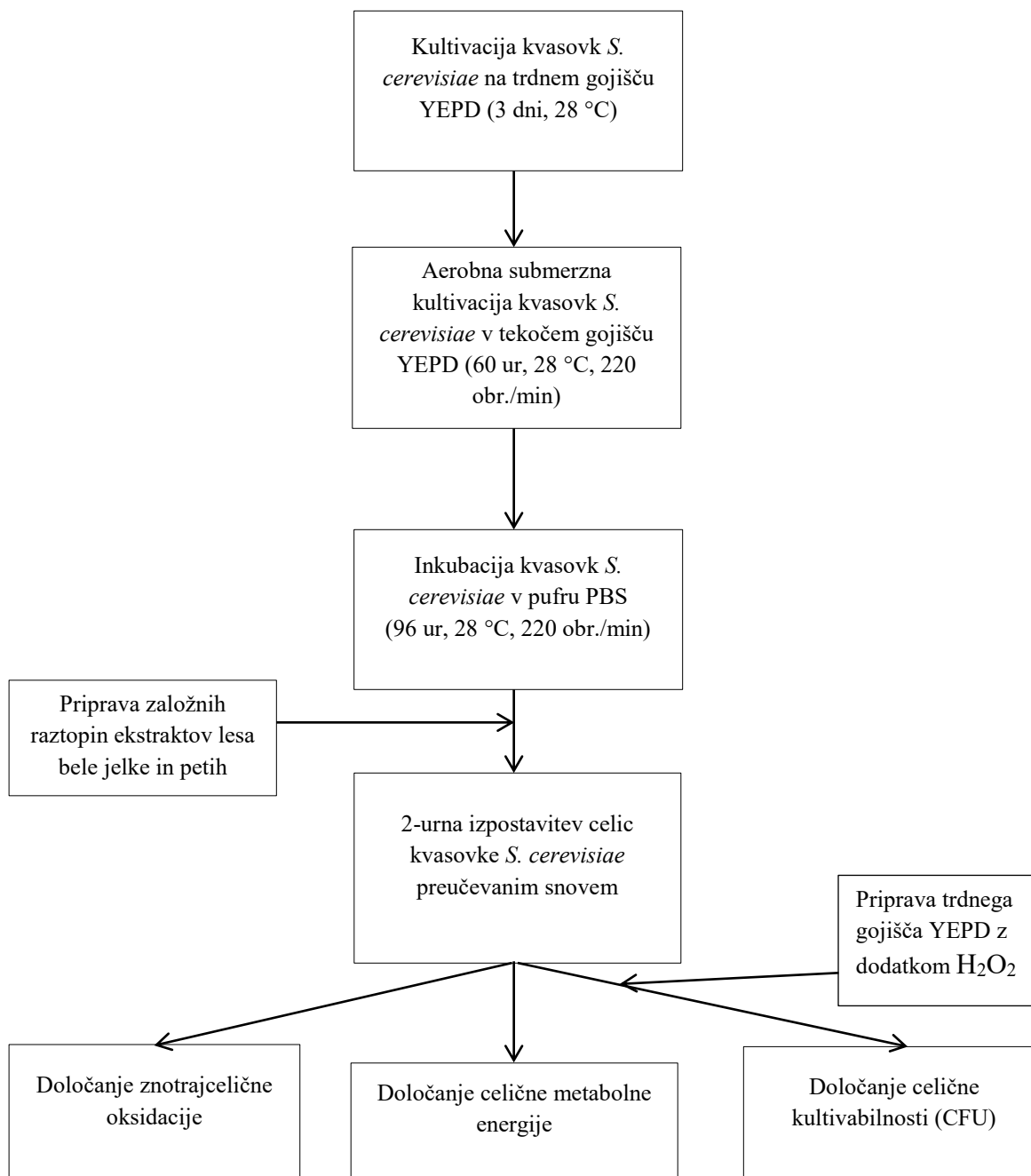
Kvasovke v stacionarni fazi lahko primerjamo z večceličnimi organizmi iz več razlogov (Longo in sod., 1996; Moradas-Ferreira in sod., 1996):

- celice so v G₀ fazi,
- poškodbe v celicah se kopičijo skozi čas,
- večino energije pridobijo z mitohondrijskim dihanjem,
- celice imajo enake obrambne mehanizme kot višji evkarionti.

Glede na rezultate raziskav na celičnem in proteomskem nivoju kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi predstavlja odličen model za raziskave oksidativnih sprememb v celicah, metabolne aktivnost in odgovor na različne okoljske stresorje (Zakrajšek in sod., 2012).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA POTEK DELA



Slika 6: Shematski prikaz poteka eksperimentalnega dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Kvasovke smo hranili na ploščah s trdnim YEPD gojiščem v inkubatorju pri temperaturi 28 °C.

3.2.2 Komercialni pripravki na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (*Abies alba*) in standardni antioksidanti

Uporabili smo dva komercialna pripravka na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (*Abies alba*), (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani) in pet standardnih antioksidantov. Vsi vzorci so bili v obliki praška.

- B: vodni izvleček iz lesa (vej) bele jelke, serija julij 2014 (FFA)
- P: vodni izvleček iz lesa (vej) bele jelke, serija oktober 2014 (FFA)
- askorbinska kislina (ASK) (Sigma)
- epigalokatehin-3-galat (EG) (Sigma)
- D- α -tokoferol sukcinat (TK) (Sigma)
- 2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluen (BHT) (Sigma)
- resveratrol (RS) (Sigma)

3.2.3 Gojišča

3.2.3.1 Precepljanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155, vzdrževanje kulture in določanje kultivabilnosti kvasnih celic

- Trdno gojišče YEPD

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Kvasni ekstrakt (Biolife)	5 g	1 % (w/v)
Pepton (Biolife)	10 g	2 % (w/v)
Glukoza (Merck)	10 g	2 % (w/v)
Agar (Biolife)	10 g	2 % (w/v)
Destilirana voda	do 500 mL	

Vse potrebne sestavine za trdno gojišče YEPD smo najprej zatehtali v čašo ter dopolnili z destilirano vodo do končnega volumna (500 mL). Gojišče smo nato sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar, 20 minut. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili in ga v laminarju razlili v sterilne petrijevke ter pustili, da se je strdilo.

- Trdno gojišče YEPD H₂O₂

V čašo smo zatehtali vse potrebne sestavine (Preglednica 2) in nato dopolnili z destilirano vodo do končnega volumna (500 mL). Gojišče smo sterilizirali pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar, 20 minut. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili, dodali določen volumen 30 % raztopine H₂O₂, da smo v gojišču dosegli koncentracijo 5 mM, in ga v laminarju razlili v petrijevke, ter pustili, da se je strdilo.

3.2.3.2 Namnoževanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 do začetka stacionarne faze rasti

- Tekoče gojišče YEPD

Preglednica 2: Sestava tekočega gojišča YEPD

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Kvasni ekstrakt (Biolife)	10g	1 % (w/v)
Pepton (Biolife)	20g	2 % (w/v)
Glukoza (Merck)	20g	2 % (w/v)
Destilirana voda	Do 1000 mL	

Sestavine za tekoče gojišče YEPD (Preglednica 2) smo najprej zatehtali v čašo ter dopolnili z destilirano vodo do končnega volumna (500 mL). Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar, 20 minut.

3.2.4 Rastopine in reagenti

3.2.4.1 Inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

- Pufer PBS (ang. phosphate-buffered saline, PBS) smo uporabili za vzdrževanje kulture v stacionarni fazi rasti.

Preglednica 3: Sestava pufra PBS

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

Eno tabletko (Oxoid) smo dali v čašo in dodali bidestilirano vodo (ddH₂O). Raztopino smo nato prenesli v bučko in dodali bidestilirano vodo do končnega volumna (100 mL). Puffer smo sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar, 20 minut.

3.2.4.2 Določanje znotrajcelične oksidacije

- 50 mM kalijev fosfatni puffer, pH 7,8

Preglednica 4: Sestava 50 mM KH₂PO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
KH ₂ PO ₄	3,40 g	50 mM
Bidestilirana voda	Do 500 mL	

Preglednica 5: Sestava 50 Mm K₂HPO₄

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
K ₂ HPO ₄	4,36 g	50 mM
Bidestilirana voda	Do 500 mL	

Kalij fosfatni puffer (50 mM) smo pripravili tako, da smo zmešali 50 mM kalijev dihidrogenofosfat (KH₂PO₄) (Preglednica 4) in 50 mM dikalijev hidrogenofosfat (K₂HPO₄) (Preglednica 5), v takšnem razmerju, da smo dosegli pH 7,8. Pripravljen puffer smo sterilizirali s filtracijo s sterilnim membranskim filtrom (velikost por 0,2 µm) in shranili v hladilnik ter ga pred samo uporabo segreli na 28 °C.

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

Preglednica 6: Priprava 1 mM založne raztopine 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (H₂DCFDA)

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
H ₂ DCFDA (Sigma)	0,0049 g	1mM
Etanol (96 % (v/v), Merck)	10 ml	

Založno raztopino H₂DCFDA smo pred vsako uporabo pripravili svežo.

3.2.4.4 Določanje kultivabilnosti kvasovke *S. cerevisiae*

- PBS pufer, (točka 3.2.4.1, Preglednica 3)
- 30 % H₂O₂ (Merck)

3.2.4.5 Merjenje celične metabolne energije

- Komplet BacTiter-GloTM Microbial Cell Viability Assay (Promega)

Komplet BacTiter-GloTM Reagent (Promega) vsebuje: substrat BacTiter-GloTM Substrate in pufer BacTiter-GloTM Buffer.

BacTiter-GloTM substrat in BacTiter-GloTM pufer smo segreli na sobno temperaturo. V stekleničko s substratom smo prenesli 10 mL pufera in ta način ustvarili encim/substrat ter tako pridobili BacTiter-GloTM reagent. Pripravljeno homogeno mešanico smo premešali, jo alikvotirali in shranili v temi. Reagent smo pred uporabo pustili stati 15 minut na sobni temperaturi.

- PBS pufer (točka 3.2.4.1, Preglednica 3)

3.3 LABORATORIJSKE APARATURE, NAPRAVE IN PRIBOR

Pri praktičnem delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo in spodaj našete aparature ter naprave, predstavljene v nadaljevanju.

3.3.1 Priprava založnih raztopin ekstraktov lesa bele jelke in petih standardnih antioksidantov (ASK, RS, TK, BHT, EG)

- Tehnica TE214 S (Sartorius)
- Vrtnično mešalo yellowline TTS 2 (IKA)

3.3.2 Priprava gojišč, raztopin, reagentov

- pH-meter Seven Easy (Mettler Toledo)
- Parni sterilizator-avtoklav (Sutjeska)
- Magnetno mešalo MM-540 (Tehtnica)
- Magnetno mešalo Rotamix 550 MMH (Tehtnica)
- Tehtnica PS 1200/C/2 (Radwag)
- Tehtnica TE214 S (Sartorius)
- Sušilnik laboratorijske steklovine SO-250 (Elektromedicina)

3.3.3 Kultivacija in inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

- Brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- Vrtinčno mešalo yellowline TTS 2 (IKA)
- Centrifuga Centric 200 (Tehtnica)
- Centrifuga Centric 322A (Tehtnica)
- Inkubator IG 150 (Jouan)
- Stresalnik Multitron (Infors HT)
- Spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- Dve 100-mL erlenmajerici s stransko kiveto z 1 utorom (SchottDuran)
- Dve 1-L erlenmajerici s stransko kiveto z 1 utorom (SchottDuran)
- 500-mL erlenmajerica s stransko kiveto (Simex)
- 50-mL merilni valj
- 100-mL merilni valj
- cepilna zanka
- avtoklavirni trak
- aluminijasta folija
- penasti zamaški

3.3.4 Merjenje znotrajcelične oksidacije

- Čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- 96-mestna črna mikrotitrsko plošča (Nunc)
- Brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- Stresalnik Multitron (Infors HT)
- Inkubator IG 150 (Jouan)
- Centrifuga Centric 200 (Tehtnica)

3.3.5 Merjenje celične metabolne energije

- Čitalec mikrotitrskih plošč Safire (Tecan)
- 96-mestne mikrotitrške plošče bele barve (Nunc)

3.3.6 Hladilniki, zmrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev

- Hladilnik (4 °C) (LTH)
- Zmrzovalnik (-20 °C) (LTH)
- Zmrzovalnik Ultra Freeze (-80 °C) (Heto)

3.4 METODE

3.4.1 Priprava založnih raztopin komercialnih pripravkov na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (*Abies alba*) in standardnih antioksidantov

Za pripravo založnih raztopin vzorcev s koncentracijo 20 g/L smo vzorce v suhi obliki raztopili v vodi ali 96 % etanolu (Preglednica 6).

Preglednica 7: Priprava založnih raztopin komercialnih pripravkov na osnovi ekstrakta lesa bele jelke (*Abies alba*) in standardnih antioksidantov

Sestavina	Zahtevana količina vzorca	Volumen dodanega topila	Koncentracija založne raztopine
B	0,04 g	2 mL dH ₂ O	20 g/L
B	0,04 g	2 mL 96 % etanola	20 g/L
P	0,04 g	2 mL dH ₂ O	20 g/L
P	0,04 g	2 mL 96 % etanola	20 g/L
ASK	0,04 g	2 mL dH ₂ O	20 g/L
EG	0,04 g	2 mL dH ₂ O	20 g/L
TK	0,04 g	2 mL 96 % etanola	20 g/L
BHT	0,04 g	2 mL 96 % etanola	20 g/L
RS	0,04 g	2 mL 96 % etanola	20 g/L

Iz založne raztopine komercialnih pripravkov in standardnih antioksidantov smo pripravili alikvote volumna 2 mL in jih shranili na -20 °C. Trideset minut pred uporabo smo alikvote segreli na sobno temperaturo.

3.4.2 Kultivacija kvasovk *S. cerevisiae*

Uporabili smo tri dni staro kulturo *S. cerevisiae*. Kulturo smo s trdnega gojišča YEPD s cepilno zanko pri sterilnih pogojih prenesli v 50 mL tekočega gojišča YEPD do optične gostote do OD₆₅₀ 0,95. Nato smo prenesli 40 mL celične suspenzije v 360 mL tekočega gojišča YEPD v 1-L erlenmajerici s stransko kiveto (Schott Duran z 1 utorom). Sledila je kultivacija kvasovk do začetka stacionarne faze rasti.

Sledil je prenos kulture v pufer PBS. Odvzeli smo 50 mL brozge (5×10^8 celic/mL), centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min in nato odstranili supernatant. Sediment smo sprali s 50 mL pufera PBS in mu dodali 50 mL pufera PBS. 40 mL nastale celične suspenzije smo prenesli v 500-mL erlenmajerico (Simex z 1 utorom) ter dodali 160 mL pufera PBS. Končna koncentracija je bila 1×10^8 celic/mL. Sledila je inkubacija kvasovk 96 ur pri 28 °C in 220 obr./min.

3.4.3 Izpostavitve celic kvasovke *S. cerevisiae* komercialnim pripravkom na osnovi ekstrakta lesa bele jelke in standardnim antioksidantom

Celice kvasovk smo inkubirali 96 h. Nato smo v 50-mL falkonke prenesli po 10 mL celične suspenzije in dodali ustrezne volumne (25 µL ali 50 µL) založnih raztopin ekstrakta lesa bele jelke ali petih standardnih antioksidantov (Preglednica 6), da smo v suspenziji celic dosegli koncentracijo preučevane snovi 0,05 g/L in 0,1 g/L. Falkonke smo zatesnili s penastimi zamaški in inkubirali suspenzijo 2h pri 28 °C in 220 obr./min v temi. Pri vsakem tretiranju smo imeli kot kontrolni vzorec kulturo, ki ni bila izpostavljena raztopini antioksidanta, ampak topilu v enakem volumnu kot je bil volumen dodane založne raztopine vzorca.

3.4.4 Določanje znotrajcelične oksidacije

Pri metodi določanja znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* smo sledili protokolu Jakubowski in sod. (2000). 2',7'-dihidrodiklorofluorescein (H₂DCF) je spojina, ki se uporablja za določanje/detekcijo H₂O₂, dušikovih oksidov in za študije oksidativnega stresa na celični ravni. Protokol temelji na metodi, pri kateri merimo fluorescenco oksidirane barvila 2',7'-dihidrodiklorofluorescein (H₂DCF). Celicam dodajamo barvilo v obliki diacetat estra (H₂DCFDA), ki zaradi svoje nepolarnosti prehaja preko membran celic. V celici H₂DCFDA postane tarča nespecifičnih esteraz, ki ga hidrolizirajo do 2',7'-dihidrodiklorofluoresceina (H₂DCF). Ker je nastali produkt polaren, ostane ujet znotraj celic in ne prehaja preko membrane. V notranjosti celic ga ROS oksidirajo do diklorofluorosceina (DCF) (Jakubowski in Bartosz, 1997).

Po izpostavitvi celične suspenzije kvasovk raztopinam preučevanih snovi smo prenesli 2 mL suspenzije celic smo v 2-mL mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min. Odstranili smo supernatant in sediment sprali z 2 mL 50 mM kalijevim fosfatnim pufrom (pH 7,8). Suspenzijo celic smo dobro premešali in centrifugirali. Sedimentu smo nato dodali 990 µL 50 mM kalijevega fosfatnega pufra, premešali in inkubirali 5 min pri 28 °C. Nato smo po končani inkubaciji v temi dodali 10 µL sveže pripravljene 1 mM raztopine H₂DCFDA (Preglednica 5). 2-mL mikrocentrifugirke smo prenesli na stresalnik in inkubirali v temi 15 min pri 28 °C in 220 obr./min. Pred prenosom na stresalnik smo falkonko smo zavili v folijo in tako preprečili izpostavitve svetlobi. Sledil je prenos 200 µL vzorcev v jamice mikrotitrne plošče. Naslednji dve uri smo spremljali kinetiko fluorescences vzorcev s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč. Iz vrednosti meritev smo lahko izračunali prirast fluorescencesne intenzitete (PFI). Rezultate smo izrazili kot povprečni relativni prirast intenzitete (RPFI) glede na kontrolo.

$$PFI = \frac{(F_K - F_Z)}{(F_Z)} \quad \dots (1)$$

F_K – FI po 2 urah merjenja oksidacije barvila

F_Z – FI v začetku merjenja oksidacije barvila

3.4.5 Določanje metabolne aktivnosti celic

Določanje celične metabolne energije kvasovke *S. cerevisiae* smo izvedli z uporabo komercialnega kompleta BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. Gre za enostavno metodo, kjer neposredno dodamo reagent v suspenzijo celic kvasovk. Komplet BacTiter-Glo™ vsebuje med drugim luciferin in luciferazo. Encim luciferaza ob prisotnosti ATP in kisika pretvori luciferin v oksiluciferin, ob čemer nastane svetloba. Luminiscenčni signal (intenziteta svetlobe) je proporcionalen količini prisotnih molekul ATP v vzorcu, kar odraža celično metabolno aktivnost. Za potek reakcije morajo biti poleg ATP prisotni se molekularni kisik in Mg²⁺ (Promega Corporation, 2012).

1 mL suspenzije celic smo prenesli v Eppendorf centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min. Odstranili smo supernatante in sedimentu dodali 1 mL pufra PBS. Suspenzijo celic smo dobro premešali in jo centrifugirali 5 min pri 1400 obr./min. Sledila je priprava desetkratne redčitve tako, da smo v novo 1,5-mL mikrocentrifugirko Eppendorf prenesli 100 µL suspenzije celic in dodali 900 µL pufra PBS. Nastalo mešanico smo dobro premešali. 100 µL desetkratne redčitve smo nanesti v jamice bele mikrotitrne plošče. V sterilno banjico smo pretočili BacTiter-Glo™ reagent, ki smo ga 15 min pred uporabo segreli na 28 °C. Vzorce smo premešali in jih nato inkubirali 5 min na sobni temperaturi. Sledila je meritev luminiscence (L). Na mikrotitrne plošče smo nanesti vzorce brez reagenta in s tem preverili vrednost optične gostote

(OD₆₅₀). Meritve smo preračunali v L/OD in rezultate izrazili kot relativne vrednosti L/OD glede na kontrolo.

3.4.6 Določanje živosti kvasovk

Živost kvasovk smo določali s posredno metodo štetja kolonijskih enot na trdnem gojišču (angl. colony forming units, CFU).

Celice kvasovke smo najprej za 2 uri izpostavili preučevanim snovem. Nato smo iz falkonke prenesli 1 mL kvasne suspenzije v sterilno 1,5-mL Eppendorf centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min. Odstranili smo supernatanta in sedimentu dodali 1 mL pufru PBS. Postopek smo ponovili dvakrat in ob koncu sedimentu dodali 1 mL pufru PBS. Sledila je priprava serijske redčitvene vrste po Kochu in nacepitev plošč. 10 µL ustrezne redčitve smo prenesli na trdno gojišče YEPD z H₂O₂. Po 72 urah inkubacije je sledilo štetje kolonij na ploščah in izračun CFU/mL. Rezultate smo izrazili kot relativne vrednosti CFU/mL glede na kontrolo, ki predhodno ni bila trenirana in je bila izpostavljena samo vodikovemu peroksidu.

3.4.7 Statistična analiza rezultatov

Rezultati so podani kot povprečne vrednosti vseh meritev znotraj določene metode:

$$\bar{x} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) \quad \dots (2)$$

\bar{x} - povprečna vrednost

n - je število vzorcev

x_i - vrednosti i-te meritve

Standardni odklon (SD) smo uporabili za oceno variabilnosti smo:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots (3)$$

\bar{x} - povprečna vrednost

n - je število vzorcev

x_i - vrednosti i-te meritve

Rezultati meritev, ki so bili narejeni na celični ravni kulture, tretirane s komercialnima pripravkoma in standardnimi antioksidanti, so bili statistično obdelani s t-testom in z Duncan testom.

Statistično značilne razlike med tretiranimi vzorci in kontrolo ter domnevo o enakosti dveh povprečji smo ugotavljali s t-testom. Če je p vrednost $\leq 0,05$, pomeni, da je razlika med aritmetičnima sredinama statistično značilna.

S testom mnogoterih primerjav s 95 % intervalom zaupanja (Duncan test) smo preverjali statistično značilne razlike med različnimi tretiranjmi.

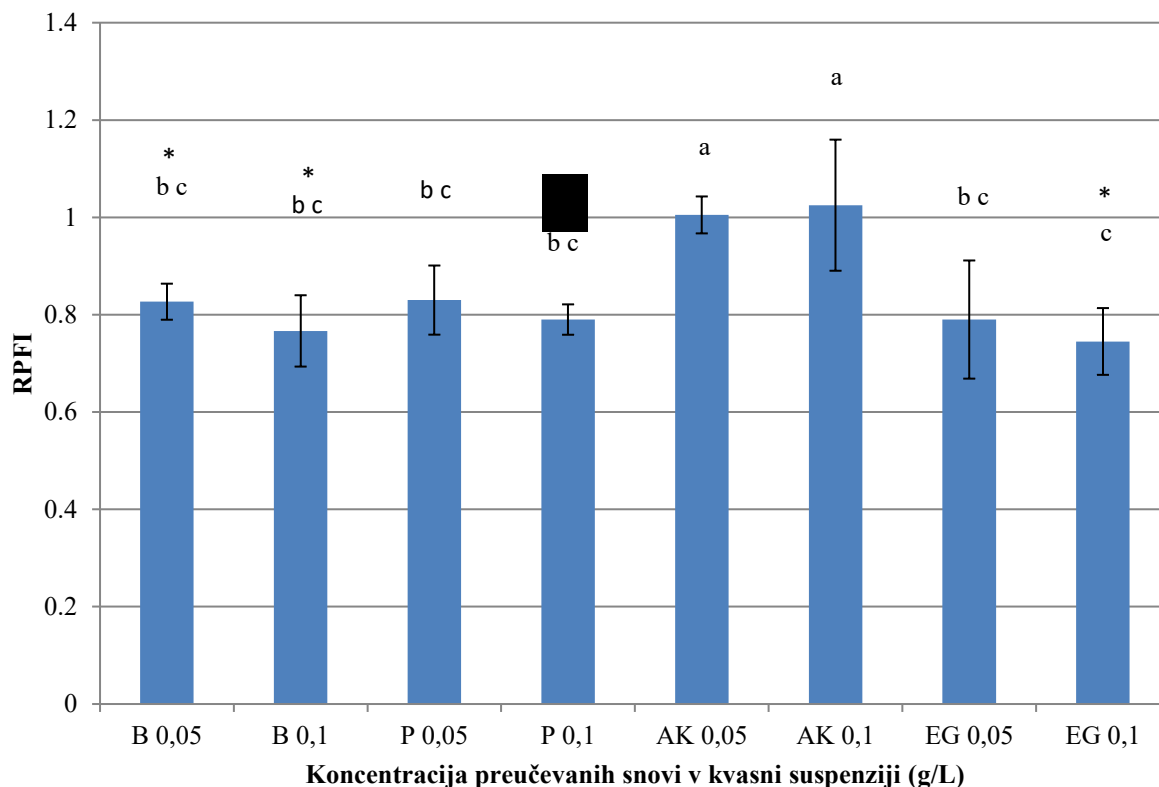
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V sklopu magistrske naloge smo preučevali antioksidativno učinkovitost komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna priprava B in P) in standardnih antioksidantov, kot so askorbinska kislina (ASK), resveratrol (RS), epigalokatehin-3-galat (EG), 2,6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen (BHT) in D- α -tokoferol sukcinat (TK) v celicah kvasovke *S. cerevisiae* kot modelnem organizmu, in sicer pri dveh različnih koncentracijah (0,05 in 0,1 g/L) v celični suspenziji. Raztopine pripravkov smo pripravili v vodi in in 96 % etanolu, standardne antioksidante pa smo raztopili v vodi ali 96 % etanolu, odvisno od njihove topnosti. Raziskali smo, kako posamezne preučevane snovi pri koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L vplivajo na znotrajcelično oksidacijo in celično metabolno energijo kvasnih celic. Nato smo preverili vlogo predtretiranja celic z omenjenimi snovmi v zaščiti celic pred oksidativnim stresom z merjenjem celične kultivabilnosti. Izbrali smo oba komercialna pripravka (B in P) in EG v koncentracijah, pri katerih so omenjeni pripravki v predhodnih analizah dokazali statistično značilno znižanje znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo.

4.1 PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI PREUČEVANIH SNOVI RAZTOPLJENIH V RAZLIČNIH TOPILIH (voda in 96 % etanol)

4.1.1 Preverjanje antioksidativne učinkovitosti vodnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) in standardnih antioksidantov (ASK, EG)

S merjenjem kinetike znotrajcelične oksidacije, pri kateri merimo fluorescenco barvila H₂DCF, smo preverili antioksidativno učinkovitost vodnih raztopin komercialnih pripravkov in standardnih antioksidantov. Z merjenjem intenzitete fluorescence lahko določimo nivo znotrajcelične oksidacije in posledično antioksidativno učinkovitost preučevanih snovi. Višja intenziteta pomeni višjo znotrajcelično oksidacijo, kar pomeni, slabšo antioksidativno učinkovitost. Slika 7 prikazuje relativne vrednosti znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* po tretiranju celic z vodnimi raztopinami preučevanih snovi, glede na kontrolo. Delovanje standardnih antioksidantov, kot sta ASK in EG *in vivo* in *in vitro* je danes že precej poznano iz literature (Davey in sod., 2000, Spanier in sod., 2009, Kim in sod., 2014) medtem ko antioksidativno delovanje komercialnih pripravkov B in P v celicah še ni bilo preučevano.



Slika 7: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi vodnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna pripravka B in P) in standardnima antioksidantoma (ASK, EG) v koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L. Rezultati so izraženi kot relativni povprečni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI) \pm SD glede na kontrolo (1). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*), se od vrednosti kontrole (1) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ (t-test). Z različnimi indeksi (a–c) so označene vrednosti, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo (Duncan test).

Pri komercialnem pripravku B smo statistično značilno znižanje znotrajcelične oksidacije kvasovke glede na kontrolo opazili pri obeh koncentracijah, in sicer pri koncentraciji 0,05 g/L za 17 % in pri 0,1 g/L za 23 %. Pri pripravku P pa je bilo statistično značilno znižanje oksidacije moč opaziti samo pri koncentraciji 0,1 g/L, in sicer za 21 % glede na kontrolo. Če primerjamo obe testirani koncentraciji, ne opazimo statistično značilne razlike v nivoju oksidacije pri nobenem od pripravkov, ravno tako tudi nismo opazili razlik med pripravkoma pri isti testirani koncentraciji. Največje znižanje znotrajcelične oksidacije glede na vrednost kontrole med vsemi preučevanimi pripravki za 26 % pa je prišlo pri EG, in sicer pri koncentraciji 0,1 g/L.

Mnoge raziskave v zadnjem času so prepoznale belo jelko kot bogat vir lignanov, flavonoidov in drugih fenolov z antioksidativno aktivnostjo (Yang in sod., 2008; Li in sod., 2011).

Benković Tavčar in sodelavci (2014) so v ekstraktu lubja bele jelke identificirali 6 fenolnih kislin (galna, homovanilna, protokatehujška, *p*-hidroksibenzojska, vanilinska, *p*-kumarna

kislina), 3 flavonoide (katehin, epikatehin in katehin tetrametil eter) in 4 lignane (taksiresinol, 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidrofuran-5-iloksi)-taksiresinol, sekoisolariciresinol in laricinresinol). Vse tri skupine molekul so bile preučevane na človeških perifernih mononuklearnih celicah in dokazali so antioksidativno delovanje preučevanega ekstrakta (Benković Tavčar in sod., 2014). Fenolne kisline delujejo antioksidativno, in sicer tako, da lovijo proste radikale. Flavonoidi so poleg lovljenja prostih radikalov sposobni tudi vezave kovinskih ionov v kelatne spojine in tako zmanjšanja oksidacije lipidov (Engeseth in Geldof, 2001), medtem ko lignani delujejo kot lovilci $\cdot\text{OH}$ (Yamauchi in sod., 2008).

Leta 2017 pa so Benković Tavčar in sodelavci analizirali še spojine vodnega ekstrakta lesa bele jelke, ki je zastopan v naših preučevanih komercialnih pripravkih (B in P) in izmerili prisotnost fenolnih kislin, flavonoidov in lignanov. Da bi ugotovili, katere spojine so odgovorne za antioksidativno delovanje v celicah, bi morali preučiti delovanje posameznih frakcij, spojin in preveriti tudi njihov vstop v celico.

Palafox-Carlos in sodelavci (2012) so pokazali, da je nemogoče predvidevati antioksidativno delovanje s preučevanjem posameznih fenolnih spojin. Fenolne kisline in flavonoidi delujejo sinergistično in posledično je njihovo antioksidativno delovanje močnejše. Prav tako so dokazali, da kombinacija galne kisline in protokatehinske kisline zaradi kemijske strukture in prisotnosti hidroksilne skupine deluje z večjo antioksidativno učinkovitostjo v primerjavi z ostalimi kombinacijami. Rezultati kažejo na izjemno sposobnost fenolnih kislin, ne le oddajanja hidroksilnih ionov radikalom, temveč tudi sposobnost oddajanja elektronov drugim fenolom in antioksidantom, zaradi katere pride do kemijske regeneracije in posledično povečanja antioksidativnega delovanja (Garcia'Alonso 2005, Palafox-Carlos in sod.2012, Leopoldini).

Tako lahko v tej fazi raziskavi predvidevamo, da vodna ekstrakta komercialnih pripravkov B in P znižata znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* glede na kontrolo verjetno zaradi sinergističnega delovanja ustreznih kombinacij snovi, prisotnih v ekstraktu lesa bele jelke (Benković Tavčar in sod., 2017).

V sklopu širše neobjavljene raziskave komercialnih pripravkov ekstrakta lesa bele jelke je bila na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil opravljena analiza proteoma lizata kvasnih celic z 2-D elektroforezo po 2-h izpostavitvi vodnim raztopinam komercialnih pripravkov (B in P) v koncentraciji 0,1 g/L. Proteinski profili tretiranih vzorcev so bili primerjani glede na kontrolo, in določeni so bili diferencialno izraženi proteini. Večje število proteinov celičnega lizata s spremenjeno ravno glede na kontrolo je bilo moč opaziti v primeru celic tretiranih s komercialnim pripravkom B. Ker identifikacija ni bila določena, sprememb proteinskega profila ne moremo povezati s celičnimi procesi.

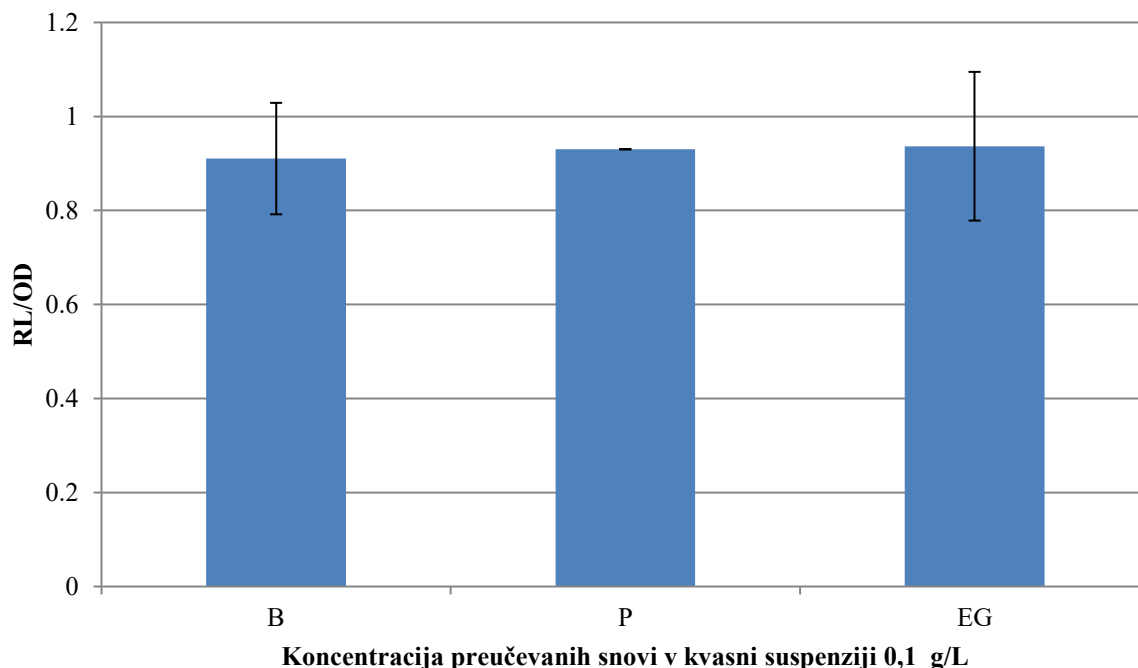
V skladu z našo naslednjo delovno hipotezo smo primerjali antioksidativno delovanje komercialnih vodnih ekstraktov pripravkov ekstrakta lesa bele jelke z že uveljavljenimi standardnimi antioksidanti. Iz rezultatov (Slika 7) je mogoče razbrati, da standardni antioksidanti v preučevanih koncentracijah v večji meri niso pokazali antioksidativnega delovanja v kvasnih celicah, ki bi bilo statistično različno glede na kontrolo, z izjemo EG.

Kljub temu, da je ASK znana kot močan antioksidant in se je v preteklih raziskavah že dokazala kot učinkovit lovilec superoksidnih radikalnih anionov, H_2O_2 in $\cdot\text{OH}$ (Barros in sod., 2011), v naši raziskavi pri preverjanju ASK v koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L nismo zaznali razlik v primerjavi s kontrolo. Razlog bi lahko bil v tem, da ASK zaradi velike hidrofilitnosti ne prehaja skozi celično membrano. Yen in sodelavci so leta 2002 potrdili, da ASK pri nizki koncentraciji reducira proste železove (Fe^{3+}) ali bakrove (Cu^{2+}) ione, ki nato donirajo elektron H_2O_2 , ta pa se preko Fentonove reakcije pretvori v visoko reaktiven hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$). Nizka koncentracija ASK lahko prav tako poveča aktivnost kisikovih radikalov. Ivanova in sodelovci (2013) so v raziskavi dokazali, da se ASK pri visokih koncentracijah (0,1 do 1 mol/L) obnaša kot antioksidant. Prooksidativen učinek je bil viden pri srednjih koncentracijah in sicer pri 10^{-3} do 10^{-4} mol/L. Prav tako so dokazali, da prooksidativne lastnosti ne izhajajo neposredno iz ASK, temveč iz produktov oksidacije dehidroaskorbinske kisline s kisikom.

Standardni antioksidant ASK se pri obeh koncentracijah statistično razlikuje od komercialnih pripravkov B in P. Glede na rezultate lahko sklepamo, da pri koncentraciji, ki smo jo uporabili, standardni antioksidant ni znižal znotrajcelično oksidacijo.

EG je pri koncentraciji 0,1 g/L statistično značilno znižal znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* glede na kontrolo in sicer za 26 %. Pri tej koncentraciji je prišlo med vsemi preučevanimi pripravki do največjega znižanja oksidacije. EG deluje antioksidativno zaradi prisotnih fenolno hidroksilnih skupin, ki so občutljive na oksidacijo in lahko generirajo kinone. Fenolno hidroksilne skupine lovijo proste radikale in tako delujejo antioksidativno. V nekaterih raziskavah se je EG pokazal kot antioksidant s potencialno najmočnejšim antioksidativnim delovanjem v primerjavi z ostalimi katehini (Higdon in sod., 2003). Yun in sodelavci (2007) so *in vivo* raziskavi ugotovili, da EG lahko zaščiti jetra podgane tako, da inhibira aktivnost jetrnih encimov (CYP2E1), ki so vpleteni pri nastanku in metabolizmu ROS. EG v naši raziskavi pri koncentraciji 0,5 g/L ni znižal nivoja znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo. Eden izmed razlogov bi bila lahko nizka koncentracija EG v celicah (Higdon in sod., 2003).

4.1.2 Preverjanje celične metabolne aktivnosti vodnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) in EG



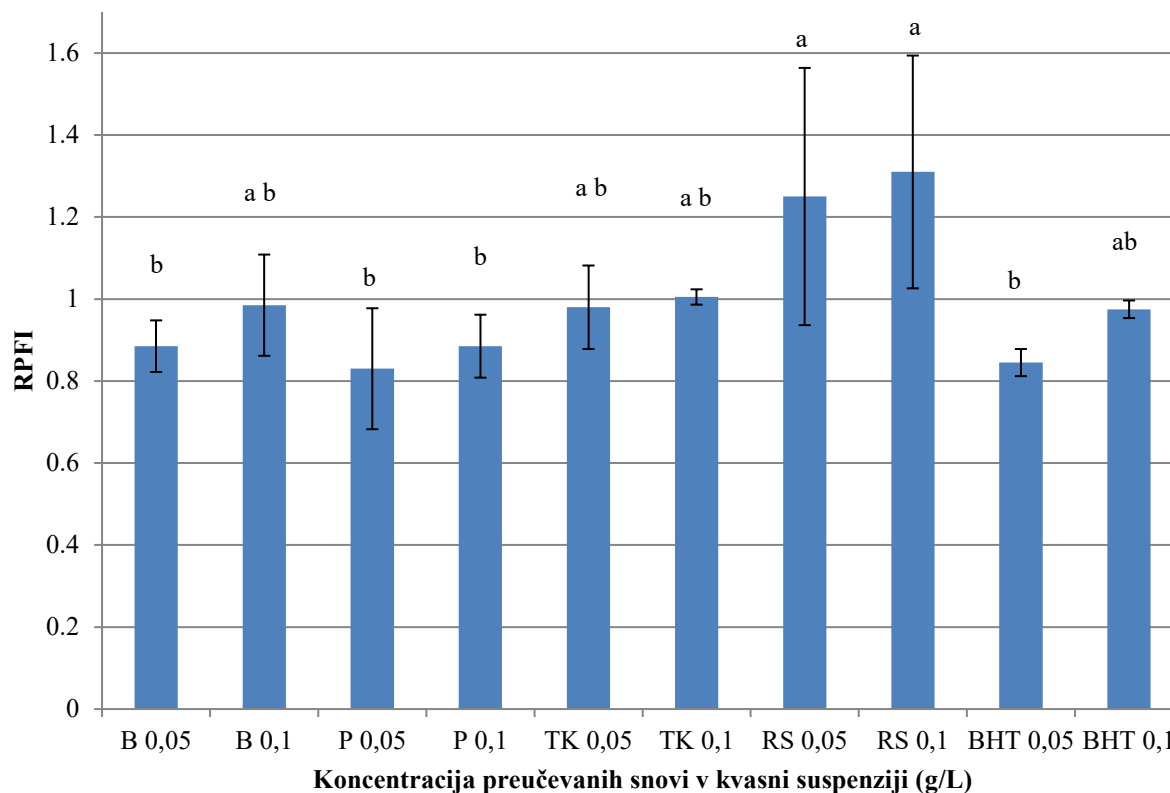
Slika 8: Celična metabolna energija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi vodnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (B, P) in standardnemu antioksidantu EG (0,1 g/L). Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti L/OD (RL/OD) ± SD glede na kontrolo.

Preverjali smo celično metabolno energijo kvasovke *S. cerevisiae* po izpostavitvi v vodnim raztopinam pripravkov B in P in EG v koncentraciji (0,1 g/L). Za B, P in EG smo se odločili, ker so se zelo dobro (statistično značilno) izkazali pri preverjanju znotrajcelične oksidacije pri koncentraciji 0,1 g/L.

Izkazalo se je, da se celična metabolna aktivnost vodnih komercialnih pripravkov B in P in EG pri koncentraciji 0,1 g/L ni razlikovala v primerjavi s kontrolo.

4.1.3 Preverjanje antioksidativne učinkovitosti etanolnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) in standardnih antioksidantov (TK, BHT in RS)

Preverili smo tudi antioksidativno učinkovitost etanolnih raztopin komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna pripravla B in P) in standardnih antioksidantov D- α -tokoferol (TK), 2,6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen (BHT) in resveratrol (RS) pri koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L v kvasni suspenziji.



Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (B in P) in standardnih antioksidantov (TK, RS in BHT) v koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L. Rezultati so izraženi kot relativni povprečni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI) \pm SD glede na kontrolo (1). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*), se od vrednosti kontrole (1) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ (t- test). Z različnimi indeksi (a–b) so označene vrednosti, ki se med seboj statistično razlikujejo (Duncan test).

Skladno z delovnimi hipotezami naloge smo preverili antioksidativno delovanje etanolnih ekstraktov komercialnih pripravkov na osnovi ekstrakta lesa bele jelke v celicah kvasovkah *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti kot modelnem organizmu. Znotrajcelična oksidacija kvasovke *S. cerevisiae* se po 2-urni izpostavitvi komercialnima pripravkoma B in P raztopljenima v etanolu v koncentraciji 0,05 in 0,1 g/L glede na kontrolo ni znižala. Pripravka B in P se v koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L med seboj statistično ne razlikujeta. V primeru (Slika 7), kjer smo uporabili vodo kot topilo je večja koncentracija (0,1 g/L) pokazala večje antioksidativno delovanje, medtem ko v primeru etanolnega topila nobena od preučevanih koncentracij ni znižala znotrajcelične oksidacije.

Topnost je ena najpomembnejših fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovin, saj določa koncentracijo spojine na površini bioloških membran in posledično vstop v celico. Zadostna topnost omogoča, da preučevana spojina doseže zadovoljiv celični privzem, učinkovite

terapevtske doze (odmerke) in minimalne stranske učinke (Blokchina in sod., 2014; Ozaki in sod., 2014). Po ugotovitvah Yang in sod. (2011) naj bi etanolni ekstrakti pripravkov, bogatih s fenolnimi spojinami, imeli nižjo ekstrahirano vsebnost fenolnih komponent in šibkejšo antioksidativno aktivnost. Laskar in sod. (2010) so potrdili, da imajo vodni ekstrakti pripravkov, bogatih s fenolnimi spojinami, večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi z etanolnimi ekstrakti. Vse več raziskav v zadnjem času preučuje kombinacijo topil voda/etanol in dokazuje produktivnejšo ekstrakcijo ter večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi z samo vodnimi ekstrakti (Mello in sod., 2010).

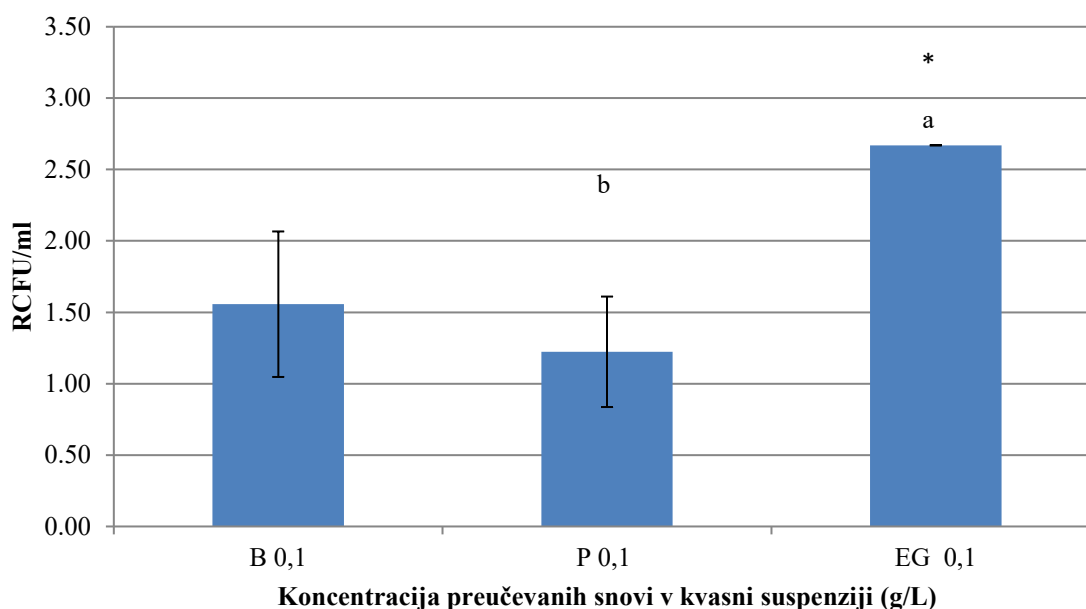
Standardni pripravek RS, raztopljen v etanolu pri koncentraciji 0,05 in 0,1 g/L ni znižal znotrajcelične oksidacije in glede na rezultate nakazuje prooksidativno delovanje, ki pa ni statistično značilno glede na kontrolo. Fukuhara in Miyata (1998) sta dokazala prooksidativno delovanje RS v prisotnosti bakrovih ionov. Baker je pomemben kovinski ion prisoten v kromatinu in tesno povezan z DNA bazami, predvsem z gvaninom. Znanih je več *in vitro* študij, kjer so dokazali prooksidativno delovanje fenolnih spojin v prisotnosti bakra kot katalizatorja oksidativnih reakcij (Margalioth in sod., 1987; Yoshida in sod., 1993; Ebara in sod. 2000). Prav tako so dokazali prooksidativno delovanje RS na mikrosomalnem sistemu jeter podgane. RS je inhibiral lipidno peroksidacijo in kljub temu pospešil nastajanje hidroksilnega radikala, s čimer so posredno dokazali, da imajo $\cdot\text{OH}$ zelo majhno vlogo pri lipidni peroksidaciji (Fukuhara K. in Miyata N., 1998) Zadnje raziskave omenjajo prednosti prooksidativnega delovanja RS na področju zdravljenja raka. RS lahko z preprečevanjem preživetja ali z razgradnjo DNA kot posledico prooksidativnega delovanja poviša občutljivost rakavih celic. RS lahko deluje sinergistično protirakavo v kombinaciji z konvencionalnimi kemoterapevtskimi agensi ali citotoksičnimi spojinami (Lastra in sod., 2007).

Dodatek standardnega antioksidanta TK pri obeh koncentracijah ni znižal znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo. Znanstevniki so v raziskavi potrdili, da TK v primeru, da ni prisotnega ko-antioksidantna kot je na primer ASK, deluje prooksidativno. V primeru, da TK uporabijo v kombinaciji z ASK kot ko-antioksidantom, ASK v tem primeru nevtralizira tokoferol radikal in tako onemogoči TK prooksidativno delovanje (Kontush in sod., 1996).

Dodatek BHT pri obeh koncentracijah (0,05 g/L in 0,1 g/L) prav tako ni znižal znotrajcelične oksidacije kvasnih celic. Med koncentracijama ni bilo opazne statistično značilne razlike. Delovanje BHT smo merili le v primeru, ko smo ga raztopili v etanolu, saj je le ta netopen v vodi. Za izboljšanje antioksidativnega delovanja namesto BHT večinoma uporabljajo kombinacijo BHA in BHT, kjer BHA reagira s peroksilnim radikalom, nastanejo nestabilne radikalne zvrsti (ariloksi radikali), ki kasneje reagirajo z BHT kar vodi do regeneracije BHA in nastanka stabilnih radikalov, ki niso sposobni nadaljevati verižne reakcije radikalov (Yehye in sod., 2015).

4.2 PREVERJANJE VLOGE PREDTRETIRANJA CELIC Z ANTIOKSIDANTI PRED OKSIDATIVNIM STRESOM Z MERJENJEM CELIČNE KULTIVABILNOSTI

Z metodo štetja kolonij na ploščah (CFU) smo želeli preveriti zaščitno vlogo predtretiranja celic kvasovk *S. cerevisiae* z vodnimi raztopinami pripravkov B in P ter standardnega antioksidanta EG v koncentraciji 0,1 g/L pred oksidativnim stresom, ki smo ga inducirali z dodatkom vodikovega peroksida. Za B, P in EG ter koncentracijo 0,1 g/L smo se odločili, ker so se vsi trije pripravki dokazali v prejšnjih raziskavah kot pripravki, ki so statistično značilno znižali znotrajcelično oksidacijo kvasovke glede na kontrolo. Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne CFU vrednosti (RCFUL)/mL glede na kulturo, ki predhodno ni bila tretirana in je bila izpostavljena samo H₂O₂ v koncentraciji 5 Mm.



Slika 9: Določanje kultivabilnosti celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi vodnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna priprava B in P) in standardnega antioksidanta EG v koncentraciji 0,1 g/L. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne CFU vrednosti (RCFUL)/mL \pm SD glede na kulturo, ki predhodno ni bila tretirana in je bila izpostavljena samo H₂O₂. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*), se od vrednosti kontrole (1) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ (t- test). Z različnimi indeksi (a–b) so označene vrednosti, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo (Duncan test).

Najprej smo določili ustrezno koncentracijo H₂O₂, kateri smo izpostavili celice kvasovke in tako vzpodbudili oksidativni stres v celicah. Odločili smo se, da uporabimo 5 mM H₂O₂. Kultivabilnost se je pri kulturi tretirani z H₂O₂ v primerjavi s kulturo, ki H₂O₂ ni bila izpostavljena zmanjšala za trikrat. Oksidativni stres povzroči povišanje ROS, kar posledično aktivira obrambne mehanizme, namenjene uravnavanju redoks ravnotežja v celicah. Oksidativni

stres lahko povzroči poškodbe celičnih komponent in posledično celično smrt. (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Jamieson, 1998; Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Dokazano je, da je učinek oksidativnega stresa pri *S. cerevisiae* veliko večji v zgodnji eksponentni fazi in zgodnji stacionarni fazi, kot v pozni stacionarni fazi (Tan in sod., 2015; Reiter in sod., 2016). Kvasovka *S. cerevisiae* ima dva gena, *cta1* za katalazo A (citoplazmi) in *ctt1* za katalazo T (peroksisom), ki razgrajujeta vodikov peroksid, pri čemer nastaneta kisik in voda (Moradas-Ferreira et al., 1996; Jamieson, 1998; Costa and Moradas-Ferreira, 2001).

Ker smo v prejšnjih testih dokazali antioksidativno delovanje vodnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) in standardnega antioksidanta (EG), smo se odločili, da preverimo še kultivabilnost celic predtretiranih z antioksidanti in naknadno tretiranih z H_2O_2 . Za določanje kultivabilnosti smo uporabili metodo štetja kolonij, s katero smo določili le celice, ki so kultivabilne. Predvidevamo, da je število živih celic večje. V populaciji so tudi take, ki zaradi oksidativnega stresa svoj metabolizem usmerijo namesto v rast v stresne odgovore. Dokazano je, da celice, ki ne tvorijo kolonij ne pomeni, da so mrtve (Nyström, 2001).

Kultivabilnost celic predtretiranih z antioksidanti in naknadno izpostavljenih vodikovemu peroksidu smo primerjali z kulturo, ki ni bila predtretirana, ampak izpostavljena samo H_2O_2 .

Kultivabilnost celic se v primeru tretiranj s pripravkoma B in P ni statistično značilno povečala glede na kulturo tretirano z H_2O_2 , zato lahko trdimo, da priprava nista zaščitila kvasnih celic pred oksidativnim stresom, povzročenim z vodikovim peroksidom. Delovanje EG v koncentraciji 0,1 g/L se statistično značilno razlikuje od delovanja obeh pripravkov B in P in pa statistično značilno poveča kultivabilnost v primerjavi s kulturo tretirano z H_2O_2 , in tako zaščiti celice kvasovke pred oksidativnim stresom. Yao in sodelavci (2008) so v raziskavi dokazali zaščitno vlogo EG v primeru izpostavitve celic stresnemu faktorju. Uporabili so človeške epiteljske celice očesne leče in jih izpostavili različnim koncentracijam H_2O_2 in EG. Preučevali so sposobnost EG, da prepreči kopičenje znotrajceličnih reaktivnih kisikovih zvrsti. EG je zaščitil celice pred celično smrtjo, do katere bi prišlo zaradi izpostavitve H_2O_2 , prav tako je uspešno zmanjšal produkcijo ROS v človeških epiteljskih celicah očesne leče, preprečil znižanje mitohondrijskega membranskega potenciala in zmanjšal vsebnost citokroma c v citosolu.

5 SKLEPI

Na osnovi rezultatov magistrske naloge lahko podamo naslednje sklepe:

Znotrajcelična oksidacija kvasovke se je po izpostavitvi vodni raztopini komercialnega pripravka B znižala v primerjavi s kontrolo pri koncentraciji 0,05 in pri 0,1 g/L, medtem, ko se je po izpostavitvi vodni raztopini komercialnega pripravka P znotrajcelična oksidacija kvasovk znižala samo pri višji koncentraciji.

V celicah kvasovke, ki so bile izpostavljene etanolnim raztopinam komercialnih pripravkov B in P v preučevanih koncentracijah ni prišlo do znižanja znotrajcelične oksidacije kvasovke.

Standardni antioksidanti z izjemo vodne raztopine EG v preučevanih koncentracijah niso pokazali antioksidativnega delovanja v kvasnih celicah.

Kultivabilnost se v primeru predtretiranja celic z vodnimi raztopinami pripravkov B in P v koncentraciji 0,1 g/L in naknadne izpostavitve induktorju oksidativnega stresa ni statistično značilno povečala glede na kulturo, ki predhodno ni bila predtretirana.

Kultivabilnost celic predtretiranih z vodno raztopino EG (0,1 g/L) je po izpostavitvi oksidativnemu stresu večja v primerjavi s celicami, ki so bile predtretirane z vodno raztopino komercialnih pripravkov ekstrakta lesa bele jelke in večja glede na kulturo, ki je bila izpostavljena oksidativnemu stresu brez predtretiranja.

6 POVZETEK

V okviru magistrske naloge smo preučevali antioksidativno učinkovitost komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke *Abies alba* (komercialna priprava B in P) in standardnih antioksidantov askorbinske kisline (ASK), resveratrola (RS), epigalokatehin-3-galat (EG), 2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluena (BHT) in D- α -tokoferol sukcinata (TK) v celicah kvasovke *S. cerevisiae* kot modelnem organizmu, in sicer pri dveh različnih koncentracijah (0,05 in 0,1 g suhega ekstrakta ali učinkovine/L) v celični suspenziji. Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi, ker predstavlja odličen model za raziskave oksidativnih sprememb v celicah, metabolno aktivnost in odgovor na različne okoljske stresorje.

Raztopine komercialnih pripravkov smo pripravili v vodi in 96 % etanolu, standardne antioksidante pa smo raztopili v vodi ali 96 % etanolu, odvisno od njihove topnosti. Raziskali smo, kako posamezne preučevane snovi pri obeh koncentracijah vplivajo na znotrajcelično oksidacijo. Izkazalo se je, da se je znotrajcelična oksidacija celic kvasovke po izpostavitvi vodni raztopini komercialnega pripravka B statistično značilno znižala pri obeh koncentracijah, medtem, ko se je po izpostavitvi vodni raztopini komercialnega pripravka P znižala le pri koncentraciji 0,1 g/L. Predvidevamo, da sta komercialna priprava B in P znižala znotrajcelično oksidacijo kvasovke zaradi sinergističnega delovanja ustreznih kombinacij snovi (fenolne kisline, flavonoidi in lignani), ki jih vsebujeta. Od standardnih antioksidantov topnih v vodi (ASK, EG) v preučevanih koncentracijah je le EG pri koncentraciji 0,1 g/L pokazal znižanje znotrajcelične oksidacije v primerjavi s kontrolo. Dodatno smo preverili celično metabolno energijo celic kvasovk po 2-urni izpostavitvi vodnim raztopinam B, P in EG pri koncentraciji 0,1 g/L, kjer se je izkazalo, da se ta ni razlikovala v primerjavi s kontrolo. Nato smo preverili še antioksidativne učinkovitosti etanolnih raztopin komercialnih pripravkov B in P ter standardnih antioksidantov topnih v etanolu (TK, BHT in RS) pri koncentracijah 0,05 g/L in 0,1 g/L v kvasni suspenziji. V primeru, ko smo uporabili vodo kot topilo sta komercialna priprava B in P delovala antioksidativno, medtem ko v primeru etanolnega topila nobena od preučevanih koncentracij ni znižala znotrajcelične oksidacije. Enako smo opazili tudi pri delovanju standardnih antioksidantov, topnih v etanolu (TK, RS in BHT).

Ker smo v prejšnjih testih dokazali antioksidativno delovanje vodnih raztopin komercialnih pripravkov (B in P) ter standardnega antioksidanta (EG), smo se odločili, da preverimo in primerjamo kultivabilnost celic predtretiranih s temi snovmi v koncentraciji 0,1 g/L in naknadno tretiranih z vodikovim peroksidom. Kultivabilnost se v primeru predtretiranj celic s pripravkoma B in P v preučevani koncentraciji ni statistično značilno povečala glede na kulturo, ki predhodno ni bila predtretirana (kontrola), medtem ko je bila kultivabilnost predtretiranih celic z vodno raztopino standardnega antioksidanta EG večja v primerjavi s kontrolo.

V magistrski nalogi smo s pridobljenimi rezultati potrdili hipotezo o znižanju znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* s komercialnim pripravkom na osnovi ekstrakta lesa bele jelke. Hipotezi, da bo znižanje znotrajcelične oksidacije po izpostavitvi celic komercialnim pripravkom v primerjavi s standardnimi antioksidanti večje in pa da bo kultivabilnost predtretiranih celic s komercialnima pripravkoma po izpostavitvi oksidativnemu stresu v primerjavi s standardnimi antioksidanti večja, nismo potrdili. Do največjega znižanja znotrajcelične oksidacije ter zvišanje kultivabilnosti v zaščiti celic pred oksidativnim stresom med vsemi preučevanimi snovmi je prišlo pri standardnem antioksidantu (EG).

7 VIRI

- Abadi A., Gotlieb K.F., Meiberg J.B. M., Van Bekkum H. 2003. New food antioxidant additive based on hydrolysis products of lactose. *Green Chemistry*, 5, 1: 47-51
- Abele D. 2002. The radical life-giver. *Nature*, 420: 27
- Afonso S.M., Ferreira S., Domingues C.F., Silva F. 2015. Resveratrol production in bioreactor: Assessment of cell physiological states and plasmid segregational stability. *Biotechnology Reports*, 5: 7-13
- Ahmad N., Gupta S., Mukhtar H. 2000. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor B in cancer cells versus normal cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376: 338-346
- André C.M., Larondelle Y., Evers D. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: A review. *Current nutrition food and science*, 6: 2-12
- Babu P.V., Liu D. 2008. Green tea catechins and cardiovascular health: An update. *Current Medical History*, 15, 18: 1840-1850
- Balentine D. A., Wiseman S. A., Bouwens L. C., 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 8: 693-704
- Benković Tavčar E., Grohar T., Žigon D., Švajger U., Janes D., Kreft S., Štrukelj B. 2014. Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 52: 23–28
- Benković Tavčar E., Žigon D., Mihailović V., Petelin T., Jamnik P., Kreft S. 2017. Identification, in vitro and in vivo antioxidant activity, and gastrointestinal stability of lignans from silver fir (*Abies alba*) wood extract. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 37, 6: 467-477
- Bitcher E., Bohn T. 2010. Methods for assessing aspects of carotenoid bioavailability. *Current Nutrition and Food Science*, 6: 44-69
- Blokhina S. V., Volkova T. V., Ol'Khovich M. V., Sharapova A. V., Proshin A. N., Perlovich G. L. 2014. Solubility and solution thermodynamics of novel bicyclic derivatives of 1,3-selenazine in biological relevant solvents. *Journal of chemical and engineering data*. 59: 2298-2304

- Bolotin-Fukuhara M., Dumas B., Gaillardin C. 2010. Yeasts as a model for human diseases. *FEMS Yeast Research*, 10: 959-960
- Botstein D., Chervitz S. A., Cherry J. M., 1997. Yeast as a model organism. *Science*, 277: 959-960
- Brent C., Waterhouse T., Waterhouse A. L., 1996. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 5: 1253-1257
- Brigelius-Flohé R., Maiorino M, 2013. Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta*, 1830: 3289-3303
- Burton G. J., Jauniaux E., 2011. Oxidative stress. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25, 3: 287-299
- Carr A. C., Vissers C. M. M. 2013. Synthetic or food-derived vitamin C-Are they equally bioavailable? *Nutrients*, 5, 1: 4284-4304
- Chan E. W. C., Soh E. Y., Tie P. P., Law Y. P., 2011. Antioxidant and antibacterial properties of green, black and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, 3, 4: 266-272
- Chaudière J., Ferrari-Iliou R., 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 9-10: 949-962
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insight into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 4-5: 217-246
- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, 329: 23-38
- Darmanyan, A. P., Gregory D. D, Guo Y., Jenks W. S., Burel L., Eloy D., Jardon P., 1998. Quenching of singlet oxygen by oxygen-and sulfur-centered radicals:evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 396-403
- Davey M. W., van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N. 2000. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825-860
- Davinelli S., Sapere N., Zella D., Scapagnini G., Bracale R., Intrieri M. 2012. Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 386527, doi: 10.1155/2014386527: 11 str.

- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 11: 1102-1115
- Donalds M. S. 2004. Nutrition and cancer: A review of the evidences for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3: 19-25
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95
- Du J., Cullen J. J., Buettner R. G. 2012. Ascorbic acid: Chemistry and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826: 443-457
- Dufresne C.J., Farnworth E. R., 2001. A review of latest research findings of the health promotion properties of tea. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 12: 202-421
- Ebara M., Fukuda H., Hatano R., Saisho H., Nagato Y., Suzuki K., Nakajima K., Yukawa, M., Kondo F., Nakayama A. 2000. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *Journal of Hepatology*, 33: 415-422
- Engeseth N.J., Geldof N. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples, *Journal of Africultural and Food Chemistry*, 50: 3050-3055
- Frei B., England L., Ames B. N. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma, *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 86: 6377-6381
- Fries E., Püttman W. 2001. Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS. *Water Research*, 36, 23: 2319-2327
- Fujisawa S., Kadoma Y., Yokoe I. 2004. Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites. *Chemistry and Physics of Lipids*, 130, 2: 189-195
- Fukuhara K., Miyata N. 1998. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8, 22: 3187-3192

- Gomberg M. 1900. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *Journal of the American Chemical Society*, 22: 757–771
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. Oxford University Press: 896 str.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584
- Higdon J. V., Frei B. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 1: 89-143
- Huh W. K., Lee B. H., Kim S. T., Kim Y. R., Rhie G. E., Baek Y. W., Hwang C. S., Lee J. S., Kang S. O. 1998. D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 30, 4: 895-903
- Ivanova I. P., Trofimova S. V., Piskarev I. M. 2013. Evaluation of prooxidant properties of ascorbic acid. *Molecular Biophysics*, 58, 4: 453-456
- Jiang Q. 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant and anti-inflammatory activities and the role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 72: 76-90
- Kancheva V.D., 2009. Phenolic antioxidants-radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 11: 1072-1089
- Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A comparative Study, *PLOS One*, 6, 2: 11 str.
- Khan N., Mukhtar H. 2007. Tea polyphenols for health promotion. *Life Science*, 81, 7: 519-533
- Kim H.S., Quon M.J., Kim J. 2014. New insight into the mechanism of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2: 187-195
- Landis G.N., Tower J. 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanism of Ageing and Development*, 126: 365-379
- Laskar R.A., Sk I., Roy N., Begum N.A. 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food and chemistry*, 122: 233-237

- Lastra de la A. C., Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35, 5: 1156-1160
- Lenaz G. 2012. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Netherlands, 942: 93-136
- Liao S., Kao Y., Hiipakka R.A. 2001. Green tea: Biochemical and biological basis for health benefits. *Vitamins & Hormones*. 62, 2001: 1-94
- Linster C.L., Van Schaftingen E., 2007. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*, 274, 1: 1-22
- Liochev S., Fridovich I. 1999. Superoxide and iron: partners in crime. *IUMLB Life*, 48, 2: 157-61
- Longo V.D., Gralla E.B., Valentine J.S. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 21: 12275-12280
- Lushchak V.I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224: 164-175
- Marchler G., Schuller C., Adam G., Ruis H., 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO Journal*, 12: 1997-2003
- Margalioth E. J., Udassin R., Cohen C., Maor J., Anteby S. O., Schenker J. G. Serum copper level in gynecologic malignancies. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1987, 157: 93-96
- Mates J. M., Perez-Gomez C., De Castro I.N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32: 595-603
- Matuo R., Sousa F.G., Soares D.G., Bonatto D., Escarqueil A.E., Larsen A.K., Henriques J.A. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 70, 4: 491-502
- McCord J. M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055

- Mello B. C. B. S., Petrus C., Hubinger M.D. 2010. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96: 533-539
- Mikuš R.P., Poljšak B. 2005. Funkcionalna hranila v zdravi prehrani. *Obzornik zdravstvene nege*, 39: 201-07
- Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. 1990. Transition metals as catalysts of »autoxidation« reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8, 1: 95-108
- Min D. B., Boff J. M., 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 58-72
- Morano K. A., Grant C. M., Moye-Rowley W. S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 1157-1195
- Mukhopadhyay A. K. 2006. Antioxidants-natural and Synthetic, Amani, Int'l Publishers Kiel, Germany
- Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C., Salvayre R. 2008. Advanced lipid peroxidation and products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, 153: 6-20
- Neophytou C. M., Constantinou A. I. 2015. Drug delivery innovations for enhancing the anticancer potential of vitamin E isoform and their derivatives. *Biomed Research International*, 2015:1-16
- Nyström T. 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology*, 176(3): 159-164
- Osada K., Takahashi M., Hoshina S., Nakamura M., Nakamura S., Sugano M., 2001. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128, 2: 153-164
- Osredkar J. 2012. Oksidativni stres. *Zdravniški vestnik*, 81: 393-406
- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12: 913-922
- Ozaki S., Nakagawa Y., Shirai O., Kano K. 2014. Substituent effect on the thermodynamic solubility of structural analogs: relative contribution of crystal packing and hydration. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103: 3524-3531

- Paquay J. B., Haenen G. R., Stender G. 2000. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5768-5772
- Perego P., Jimenez G. S., Gatti L., Howell S. B., Zunino F. 2000. Yeast mutants as a model system for identification of determinants of chemosensitivity. *Pharmacological Reviews*, 52: 477-491
- Pham-Huy L. I., He H., Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 2: 89-96
- Pokorný J., 2007. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109: 629-642
- Poljšak B., Pandel Mikuš R. 2005. Funkcionalna hranila v zdravi prehrani. *Obzornik zdravstvene nege*, 39: 201-207
- Rahman K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2: 219-236
- Ratnam D. V., Ankola D. D, Bhardwaj V., Sahana D. K., Kumar N. M. V. R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113: 189-207
- Rege S. D., Geetha T., Griffin G.D., Broderick T. L., Babu J. R. 2014. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front Aging Neuroscience*, 6: 218
- Sathiyamoorthi R., Sankaranarayanan G. 2016. Effect of antioxidant additives on the performance and emission characteristics of a DICl engine using neat lemongrass oil-diesel blend. *Fuel*. 174: 89-96
- Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M. 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30, 2: 91-113
- Spanier G., Xu H., Xia N., Tobias S., Deng S., Wojnowski L., Forsermann U., Li H. 2009. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (sod1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60, 4:111-116
- Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A., Nilsa R. D., Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 10: 1343-1312

- Valko M., Leibfritz D., Mancol J., Cronin MT. D., Mazur M., Telser J. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interaction*, 160: 1-40
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84
- Vitaglione P., Storza S., Galaverna G., Ghidini C., Caporaso N., Vescovi P.P., Fogliano V., Marcelli R. 2005. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 5: 495-504
- Vitrac X., Desmoulière A., Brouillaud B., Krisa S., Deffieux G., Barthe N., Rosenbaum J., Mérillon J.M. 2003. Distribution of 14-C-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Science*, 72, 20: 2219-2233
- Wang H., Yang Y.J., Qian H.Y., Zhang Q., Xu H., Li J.J. 2012. Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? *Heart Failure Review*, 17, 3: 437-448
- Wang Y., Chen H., Yu O. 2010. Metabolic engineering of resveratrol and other longevity boosting compounds. *BioFactors*, 36, 5: 394-400
- Wang Y., Halls C., Zhang J., Matsuno M., Zhang Y., Yu O. 2011. Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 13, 5: 455-463
- Weidinger A., Kozlov A. V. 2015. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5: 472-484
- Wenzel E., Somoza V. 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 5: 472-481
- Westergren, M., Poljanec, A., Kraigher, H., 2010. Tehnične smernice za ohranjanje in rabo genskih virov: bela jelka (*Abies alba*) Slovenija. *Gozdarski vestnik*, 68, 19: 491-494
- Willcox J. K., Ash S. L., Catignani G. L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 4: 275 -295
- Xia N., Daiber A., Förstermann U., Li H. 2016. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174: 1633-1646

- Yang H., Dong Y., Du H., Shi H., Peng Y., Li X., 2011. Antioxidant compounds from propolic collected in Anhui, China. *Molecules*, 16: 3444-3455
- Yamauchi S., Masuda T., Sugahara T., Kawaguchi Y., Ohuchi M., Someya T., Akiyama J., Tominaga S. 2008. Antioxidant Activity of butane type lignans, secoisolariciresinol, dihydroguaiaretic acid, and 7,7'-oxodihydroguaiaretic acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72: 2981-2986
- Yao K., Ye P., Zhang L., Tan J., Tang X., Zhang Y., 2008. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells. *Molecular Vision*, 14: 217-223
- Ye Zhi-Wei, Zhang J., Townsend D.M., Tew D.K. 2014. Oxidative stress, redox regulation and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 8: 1607-1621
- Yehye W.A., Rahman N.A., Ariffin A., Hamid S.B.A., Alhadi A.A., Kadir F.A., Yaeghoobi M. 2015. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101: 295-312
- Yen G.C., Duh P.D., Tsai H.L. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79: 307-313
- Yoshida, D., Ikeda, Y., Nakazawa, S. 1993. Quantitative analysis of copper, zinc and copper/zinc ratio in selected human brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 16: 109-115
- Yun J.W., Kim Y.K., Lee B.S., Kim C.W., Hyun J.S., Baik J.H., Kim J.J., Kim B.H. 2007. Effect of dietary epigallocatechin-3-gallate on cytochrome P450 2E1-dependent alcoholic liver damage: Enhancement of fatty acid oxidation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 12: 2999-3006
- Zakrajšek T. 2014. Vpliv eksogenih antioksidantov na endogeni antioksidativni obrambni sistem pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 160 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Poloni Jamnik za strokovno pomoč, nasvete in pregled magistrskega dela in za spodbude.

Posebej se zahvaljujem dr. Tanji Petelinc za njeno nesebično pomoč in razpoložljivost pri eksperimentalnem delu magistrske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič za strokoven pregled magistrske naloge.

Zahvaljujem se dr. Karmen Stopar za čas in pomoč pri pregledu in urejanju magistrskega dela.

Hvala Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil in celotnemu osebju.

Posebna zahvala gre moji družini, ki je me vsa leta izobraževanja spodbujala in bodrila. Hvala, ker ste verjeli vame in mi omogočili, da sem lahko sledila svojim sanjam ter me ob tem podpirali.

PRILOGA A

Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi komercialnim pripravkom (B in P) in standardnim antioksidantom v vodi (AK, RS in EG) ter po izpostavitvi komercialnim pripravkom (B in P) in standardnim antioksidantom (TK, BHT, RS in EG) v etanolu.

Priloga A1: Meritev flourescenčne intenzitete (F1) znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi vodnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna priprava B in P) in standardnih antioksidantom (AK, RS in EG) v koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L. Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti FI.

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	B (0,05 g/L)	B (0,1 g/L)
0	4335	4178	4096	3882
30	6227	5773	5419	5281
60	9642	9411	8440	8025
90	12396	11624	10359	10261
120	14638	13753	11954	11572

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	B (0,05 g/L)	B (0,1 g/L)
0	4186	4132	3698	4021
30	6010	5728	5000	5271
60	9708	9728	7622	8056
90	12636	13357	10407	10425
120	15043	16207	11767	11827

Ponovitev 3				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	B (0,05 g/L)	B (0,1 g/L)
0	4555	4366	4267	4145
30	7152	6684	6331	6011
60	12586	11828	10473	9807
90	15900	15448	13687	12217
120	19960	19524	16916	14856

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	P (0,05 g/L)	P (0,1 g/L)
0	4511	4304	4331	4304
30	7005	6237	6111	6019
60	10997	10011	9565	9358
90	13101	12350	11922	11324
120	15680	14893	14010	13008

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	P (0,05 g/L)	P (0,1 g/L)
0	4238	4090	4238	4303
30	5632	5447	5332	5580
60	10610	10466	9819	10104
90	15433	15615	13326	13910
120	21854	22901	18455	18550

Ponovitev 3				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	P (0,05 g/L)	P (0,1 g/L)
0	4623	4490	4271	4348
30	6225	6365	5449	5497
60	11009	11299	10946	9772
90	16295	15441	13242	13205
120	23870	22228	18273	18225

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	ASK (0,05 g/L)	ASK (0,1 g/L)
0	4670	4649	4565	4665
30	6424	6411	6459	6555
60	10986	11503	11140	11545
90	14891	16281	14930	15231
120	19868	22075	20191	19893

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	ASK (0,05 g/L)	ASK (0,1 g/L)
0	5495	4385	4252	4256
30	7645	6995	6254	6176
60	13048	12388	11140	11622
90	16531	15246	14394	15221
120	20840	20130	18052	19294

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	RS (0,05 g/L)	RS (0,1 g/L)
0	3659	3818	3680	3954
30	4441	4609	4377	4662
60	7442	7511	7115	7450
90	10218	10419	9141	9936
120	13195	13593	11561	12442

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	RS (0,05 g/L)	RS (0,1 g/L)
0	4106	4169	4235	4011
30	5708	5608	5748	5264
60	9325	8504	9412	8713
90	12263	11001	11924	11021
120	15446	13434	14789	13283

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	EG (0,05 g/L)	EG (0,1 g/L)
0	4492	4483	4463	4680
30	6496	6601	6142	6448
60	10803	10539	9706	9758
90	13991	12907	11771	11895
120	17740	16482	14281	14754

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	EG (0,05 g/L)	EG (0,1 g/L)
0	4554	4404	4497	4720
30	6590	5933	5849	6069
60	10035	10075	9283	9294
90	11964	11984	11024	10846
120	15051	14750	12861	12676

Priloga A2: Meritev fluorescence intenzitete (F1) znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna priprava B in P) in standardnih antioksidantov D- α -tokoferol sukcinat (TK), 2,6-diterciarni butil-*p*-hidroksi toluen (BHT), RS in EG pri njihovih različnih koncentracijah (0,05 in 0,1 g/L). Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti FI.

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	B (0,05 g/L)	B (0,1 g/L)
0	4311	4495	4312	4275
30	6427	6791	5949	5920
60	10275	10878	10157	9877
90	12933	13669	12305	12311
120	16314	17284	14534	15057

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	B (0,05 g/L)	B (0,1 g/L)
0	4712	4535	4580	4780
30	6698	6120	5987	6212
60	11460	10266	9944	11989
90	14329	13173	12865	15107
120	18809	17041	16848	19503

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	P (0,05 g/L)	P (0,1 g/L)
0	4311	4495	4817	4516
30	6427	6791	6873	6543
60	10275	10878	10779	10992
90	12933	13669	12291	12909
120	16314	17284	14649	15031

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	P (0,05 g/L)	P (0,1 g/L)
0	4712	4535	4680	4770
30	6698	6120	5989	6098
60	11460	10266	10470	11126
90	14329	13173	13286	13612
120	18809	17041	17253	17609

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	TK (0,05 g/L)	TK (0,1 g/L)
0	5745	4592	5497	5232
30	9643	7296	8030	7529
60	10718	9080	10585	9838
90	12989	11220	12359	12606
120	16964	14124	17130	15926

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	TK (0,05 g/L)	TK (0,1 g/L)
0	4433	4547	4841	4865
30	5988	5577	5845	5706
60	9866	9598	10342	10989
90	12221	12116	12752	13343
120	16201	15293	15888	16958

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	BHT (0,05 g/L)	BHT (0,1 g/L)
0	4662	4659	4988	4437
30	6798	6750	6608	5786
60	11349	11536	11526	10456
90	15431	14991	14759	14262
120	19285	18239	18083	17755

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	BHT (0,05 g/L)	BHT (0,1 g/L)
0	4347	4233	4347	4518
30	6567	6094	5772	6248
60	10417	10479	9853	10935
90	13072	13087	11984	13712
120	16557	16992	14733	17162

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	RS (0,05 g/L)	RS (0,1 g/L)
0	3659	3818	4557	4665
30	4441	4609	5743	6290
60	7442	7511	9932	11183
90	10218	10419	13384	14331
120	13195	13593	16689	18068

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	RS (0,05 g/L)	RS (0,1 g/L)
0	4106	4169	4948	4916
30	5708	5608	7919	7751
60	9325	8504	14700	14501
90	12263	1101	18612	18736
120	15446	13434	23117	23449

Ponovitev 1				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	EG (0,05 g/L)	EG (0,1 g/L)
0	4554	4404	4711	4869
30	6590	5933	5936	6115
60	10035	10075	10428	10273
90	11964	11984	11720	11829
120	15051	14750	13841	13898

Ponovitev 2				
Čas (min)	Kontrola 1	Kontrola 2	EG (0,05 g/L)	EG (0,1 g/L)
0	4492	4483	4770	4776
30	6496	6601	6910	6550
60	10803	10539	12040	10881
90	13991	12907	14211	12999
120	17740	16482	17410	15913

Priloga A3: Meritev flourescenčne intenzitete (F1) znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi vodnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna priprava B in P) in standardnih antioksidantov (AK, RS in EG) v koncentracijah 0,05 in 0,1 g/L. Rezultati so izraženi kot relativni prirast flourescenčne intenzitete (RFPI) \pm SD glede na kontrolo (1).

Ponovitev	Kontrola	B (0,05 g/L)	B (0,1 g/L)
1	1	0,82	0,85
2	1	0,79	0,70
3	1	0,87	0,75
Povprečje	1	0,83	0,77
\pm	\pm		
SD	0	0,04	0,07

Ponovitev	Kontrola	P (0,05 g/L)	P (0,1 g/L)
1	1	0,91	0,82
2	1	0,77	0,76
3	1	0,81	0,79
Povprečje	1	0,83	0,79
\pm	\pm		
SD	0	0,07	0,03

Ponovitev	Kontrola	AK (0,05 g/L)	AK (0,1 g/L)
1	1	0,98	0,93
2	1	1,03	1,12
Povprečje	1	1,00	1,03
\pm	\pm		
SD	0	0,04	0,13

Ponovitev	Kontrola	RS (0,05 g/L)	RS (0,1 g/L)
1	1	0,83	0,82
2	1	1,00	0,93
Povprečje	1	0,92	0,88
\pm	\pm		
SD	0	0,12	0,07

Ponovitev	Kontrola	EG (0,05 g/L)	EG (0,1 g/L)
1	1	0,78	0,77
2	1	0,80	0,72
Povprečje ±	1 ±	0,79	0,74
SD	0	0,01	0,03

Priloga A4: Meritev flourescenčne intenzitete (F1) znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnim raztopinam komercialnih pripravkov iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialna priprava B in P) in standardnih antioksidantov D- α -tokoferol sukcinat (TK), 2,6-diterciami butil-*p*-hidroksi toluen (BHT), RS in EG pri njihovih različnih koncentracijah (0,05 in 0,1 g/L). Rezultati so izraženi kot relativni prirast flourescenčne intenzitete (RFPI) \pm SD glede na kontrolo (1).

Ponovitev	Kontrola	B (0,05 g/L)	B (0,1 g/L)
1	1	0,84	0,90
2	1	0,93	1,07
Povprečje ±	1 ±	0,89	0,98
SD	0	0,06	0,12

Ponovitev	Kontrola	P (0,05 g/L)	P (0,1 g/L)
1	1	0,73	0,83
2	1	0,93	0,94
Povprečje ±	1 ±	0,83	0,88
SD	0	0,15	0,08

Ponovitev	Kontrola	TK (0,05 g/L)	TK (0,1 g/L)
1	1	1,05	1,02
2	1	0,91	0,99
Povprečje ±	1 ±	0,98	1,00
SD	0	0,10	0,02

Ponovitev	Kontrola	BHT (0,05 g/L)	BHT (0,1 g/L)
1	1	0,87	0,99
2	1	0,82	0,96
Povprečje ±	1 ±	0,84	0,98
SD	0	0,03	0,02

Ponovitev	Kontrola	RS (0,05 g/L)	RS (0,1 g/L)
1	1	1,03	1,11
2	1	1,47	1,51
Povprečje ±	1 ±	1,25	1,31
SD	0	0,31	0,28

Ponovitev	Kontrola	EG (0,05 g/L)	EG (0,1 g/L)
1	1	0,83	0,80
2	1	0,94	0,83
Povprečje ±	1 ±	0,89	0,81
SD	0	0,08	0,02

PRILOGA B

Preverjanje kultivabilnosti kvasnih celic

Priloga B1: Določanje kultivabilnosti kvasnih celic po 2-urni izpostavitvi komercialna pripravka iz ekstrakta lesa bele jelke (komercialni pripravek B in P) in standardnemun antioksidantu (EG). Rezultati so izraženi kot relativni CFU (RCFU)/ml) \pm SD glede na kontrolo (1) .

Ponovitev	K+	K-	B (0,1 g/L)	P (0,1 g/L)	EG (0,1 g/L)
1	1	2,33	1,00	1,00	2,67
2	1	3,33	1,67	1,67	/
3	1	3,33	2,00	1,00	2,67
Povprečje \pm	1	3 \pm	1,56	1,22	2,67
SD	0	0,58	0,51	0,39	0

K+ predstavlja kulturo, ki predhodno ni bila tretirana in je bila izpostavljena samo H₂O₂.

K- predstavlja kulturo, ki predhodno ni bila tretirana in ni bila izpostavljena H₂O₂.

/ označuje , da za vrednost ni podatka