

# Učinak monomera (TEGDMA i HEMA) koji se ispiru iz ortodontskih adhezivnih sustava na metaboličku aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

---

Sabadi, Domagoj

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:987852>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Domagoj Sabadi

**Učinak monomera (TEGDMA i HEMA) koji se ispiru iz  
ortodonskih adhezivnih sustava na metaboličku aktivnost  
kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

Završni rad

Rijeka 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Domagoj Sabadi

**Učinak monomera (TEGDMA i HEMA) koji se ispiru iz  
ortodonskih adhezivnih sustava na metaboličku aktivnost  
kvasca *Saccharomyces cerevisiae***

Završni rad

Rijeka 2019.

Mentor rada: izv. prof.dr.sc Gordana Čanadi Jurešić, dipl.ing.

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. izv. prof.dr.sc Gordana Čanadi Jurešić, dipl.ing.

Rad ima 27 stranica, 15 slika, 3 tablice, 20 literaturnih

navoda.

## **Zahvala**

Zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Gordani Čanadi Jurešić na prenesenom znanju i vodstvu pri izradi ovog završnog rada. Hvala Vam na izdvojenom vremenu, uloženom trudu i potpori koju ste mi pružali za vrijeme pisanja ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, rodbini i prijateljima koji su mi oduvijek pružali potporu i vjerovali u mene u svakom trenutku. Hvala vam na strpljenju i podršci.

## Sažetak

Ortodonski adhezivni sustavi, odnosno zubna ljepila, u sebi sadrže različite tvari koje, ukoliko ono dovoljno ne očvrstne, izlaze van ljepila. Od tih molekula, naglasak je u ovome istraživanju na monomere HEMA (2-hidroksietilmetakrilat) i TEGDMA (trietilen glikol dimetakrilat). Oba monomera su bezbojne tekućine koje mogu uzrokovati apoptozu stanica, poremetiti ili odgoditi stanične cikluse, spojiti se s glutationom (pri čemu stvaraju slobodne kisikove radikle, što će dovesti do oksidativnoga šoka stanice) ili mogu oštetiti DNA (delecija baza ili dvolančani lomovi uzduž molekule DNA).

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj tih monomera na vijabilnost i metaboličku aktivnost stanica kvasaca iz soja *Saccharomyces cerevisiae* W303.

Vijabilnost je promatrana promjenom broja stanica na početku i nakon 20 sati rasta u 3 vrste hranjivih podloga - jedna tretirana monomerom HEMA, druga monomerom TEGDMA, a treća je ostala netretirana kao kontrola. Dokazano je da oba monomera usporavaju rast ili ubijaju stanice jer je broj stanica kod oba monomera bio manji nego u kontrolnom uzorku, no pokazalo se da HEMA više djeluje na vijabilnost kvasca nego TEGDMA.

Metabolička se aktivnost ispitivala koristeći Live/Dead Yeast Viability Kit za bojanje uzorka koji se potom mikroskopira na fluorescentnom mikroskopu. Oba monomera stvaraju sličan udio metabolički aktivnih (na fluorescentnom mikroskopu vidljive kao plave stanice s crvenim CIVS-om) i mrtvih stanica (na fluorescentnom mikroskopu vidljive kao žuto-zelene stanice), ali HEMA stvara manji udio metabolički inaktivnih stanica (na fluorescentnom mikroskopu vidljive kao žarko crvene stanice). Također, monomer TEGDMA stvara posebne stanice sa zelenim polumjesečastim rubom, čije se nastajanje nije uspjelo objasniti. The main focus is on

**Ključne riječi:** monomer HEMA, monomer TEGDMA, vijabilnost, metabolička aktivnost

## Summary

Orthodontic adhesive systems, also known as denture resin, consist of many different substances which can be released from those systems if not hardened enough. Out of all those substances, the main focus in this research is on monomers HEMA (2-hydroxyethylmethacrylate) and TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate). Both monomers are colorless fluids that can cause cell apoptosis, disrupt or delay cell cycles, merge with glutathione to produce free oxygen radicals (which will cause oxidative cell shock within the cell) or may damage the DNA molecule (be it by deleting certain base pairs or by causing double strand breaks along the DNA molecule).

The aim of this study was to investigate the influence of these monomers on the viability and metabolic activity of yeast cells from *Saccharomyces cerevisiae* W303.

The viability was observed by the change in the number of the cells while they grew in media for 20 hours. Out of three media, two of them were treated with monomers; one with HEMA monomer and the other one with TEGDMA monomer. The last medium was left untreated. The results showed that both monomers slowed down the reproduction of yeast cells or killed the cells, since the numbers of newly reproduced cells in both media (which were treated by those monomers) were lower than the number of cells in the control group. Also, HEMA monomer showed a greater impact on the viability of the yeast cells, compared to TEGDMA monomer.

Monomer's impact on metabolic activity of the yeast cells was examined by the LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, which was used to stain the cells. Afterwards, those cells were microscopied by a fluorescence microscopy. The monomers ended up producing a similar number of metabolically active (viewed as red cells) and dead cells (viewed as green cells), but it was shown that HEMA monomer produces a lesser number of metabolically inactive cells, compared to the number produced by TEGDMA. Also, TEGDMA monomer somehow created special cells with a green crescent edge, whose creation and formation couldn't be explained yet.

**Key words:** HEMA monomer, TEGDMA monomers, viability, metabolic activity

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1	HEMA.....	1
1.2	TEGDMA .....	4
1.3	Kvasci .....	5
2	Cilj istraživanja.....	9
3	Materijali i metode.....	10
3.1	Materijali.....	10
3.1.1	Radni kvasac.....	10
3.1.2	Uređaji, laboratorijski pribor i kemikalije.....	10
3.2	Metode .....	11
3.2.1	Priprema hranjive podloge .....	11
3.2.2	Uzgoj kvasaca.....	11
3.2.2.1	Brojanje kvasaca.....	12
3.2.3	Priprema pufera za ispiranje (GH-pufer) .....	13
3.2.4	Protokol određivanja metaboličke aktivnosti kvasaca.....	13
3.2.4.1	Priprema suspenzije i bojanje stanica kvasaca .....	14
3.2.4.2	Mikro-titarska analiza .....	14
4	Rezultati .....	16
5	Rasprava .....	23
5.1	Određivanje vijabilnosti kvasca .....	23
6	Zaključak.....	27
7	Literatura .....	28



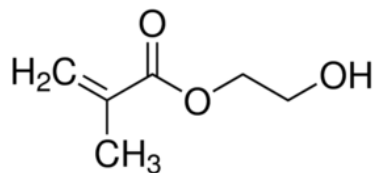
## 1. Uvod

Monomeri su male molekule koji procesom polimerizacije, odnosno međusobnim spajanjem kovalentnim vezama tvore veće molekule, točnije polimere, koji danas grade čitav niz materijala korištenih u područjima ljudskih djelatnosti; od industrije i medicine pa do uobičajenih materijala kao što su metali, drvo, keramika, staklo i sl.

Monomeri HEMA (2-hidroksietilmetakrilat) i TEGDMA (trietilen glikol dimetakrilat) nalaze se u zubnome ljepilu koji, ukoliko dovoljno ne očvrсне, iz svoje matrice oslobađa navedene monomere (1). Ti monomeri daljnjim otpuštanjem mogu doći do sluznice usne šupljine i zubne pulpe, gdje dolaze u kontakt s različitim stanicama imunološkog sustava, djelujući pri tome na funkciju i vitalnost stanica usne šupljine tako što uzrokuju inhibiciju stanične proliferacije ili diferencijacije, upalne probleme ili apoptozu. Uz to, prethodnim istraživanjima dokazano je da uzrokuju kontaktni dermatitis kod stomatološkog osoblja (2).

### 1.1 HEMA

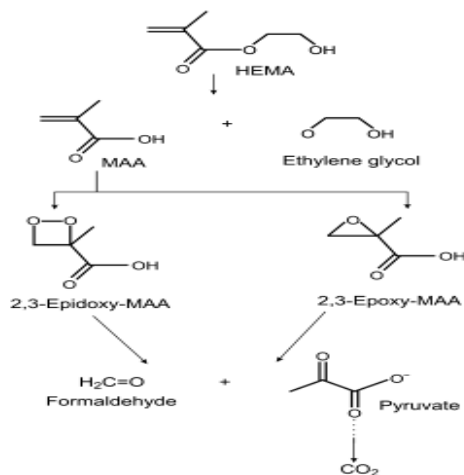
2-hidroksietil-metakrilat (HEMA) je monomerski ester. To je bezbojna tekućina s kemijskom formulom  $C_6H_{10}O_3$ . Molarna masa iznosi 130,143 g/mol, viskoznost 8.4 mm<sup>2</sup>/s pri 20 °C, a pri 25 °C gustoća mu iznosi 1,073 g/cm<sup>3</sup>. Temperatura tališta iznosi - 99 °C (174,15 K), temperatura vrelišta 213 °C (486,15 K), a temperatura zapaljenja, odnosno ona najniža temperatura pri kojoj tekućina stvara zapaljivu smjesu sa zrakom, iznosi 97 °C (370,15 K) (3).



Slika 1. Strukturna formula 2-hidroksietilmetakrilata (HEMA)

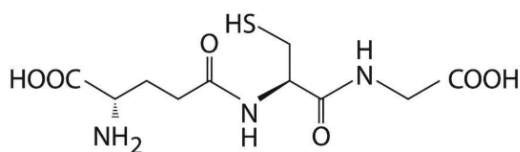
2-hidroksietil-metakrilat (HEMA) bio je jedan od prvih monomera korišten u proizvodnji hidrogelova u području biomedicine. Hidrogel je gel koji je sadrži trodimenzionalnu mrežu hidrofilnih polimera i kopolimera, a čine ga voda, polietilen oksid, poliakrilamidi te polivinilpirolidioni, a specifičan je zbog svoje mogućnosti apsorpiranja vode. 1953. godine, češki kemičari Drahoslav Lim i Otto Wichterle sintetizirali su poli(2-hidroksietilmetakrilat) (pHEMA) koristeći otopine 2-hidroksietilmetakrilata, amonijev persulfat i natrijev pirosulfit kao katalizatore te trietilenglikol-dimetakrilat (TEGDMA). Taj gel je mogao apsorpirati do 40% vode, a zbog svoje prozirnosti počeo se koristiti u proizvodnji prvih očnih leća (4). Danas se hidrogel još koristi kod plastičnih operacija u svrhu povećanja volumena pojedinih dijelova tijela (npr. bedra i stražnjica), kod popunjavanja bora na licu i vratu, kod hidratacije suhih rana te drži ranu vlažnom apsorpirajući eksudat.

HEMA je bazirana na metakrilnoj kiselini (MAA), koja je često korištena u proizvodnji različitih biomaterijala, uključujući zubna ljepila. Zbog nepotpunog procesa polimerizacije zubnog ljepila, dolazi do izlivanja slobodnih monomera u usnu šupljinu. Osim nepotpunog procesa polimerizacije, monomeri se još mogu osloboditi i enzimatskom degradacijom samoga polimera. HEMA na svojoj površini sadrži estersku skupinu, pa zbog toga može biti pogođena djelovanjem esteraza usne šupljine, gdje dolazi do njezinog raspada i nastajanja metakrilne kiseline. Na dalje, metakrilna se kiselina može podvrgnuti daljnjem raspadanju te mogu nastati različiti spojevi koji ulaze u krvotok i dospijevaju u različite organe, gdje svojom povišenom koncentracijom mogu uzrokovati biološke smetnje.



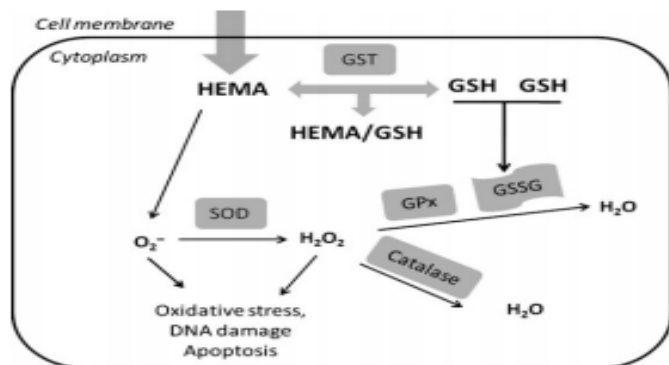
**Slika 2.** Mogući načini degradacije 2-hidroksietil metakrilata (HEMA)

Od genotoksičnog djelovanja HEMA, ističu se izazivanje oštećenja DNA (stvara dvolančani lom), različite mutacije, apoptoza, poremećaj staničnog ciklusa te promjene u genskoj ekspresiji. Iz prethodnih radova (5) dokazano je da apoptoza inducirana djelovanjem monomera je zapravo „stanični odgovor“ na prekomjernu razinu slobodnih kisikovih radikala u stanici jer je stanica u nemogućnosti održati oksido-redukcijsku homeostazu. To se toksično djelovanje temelji na vezanju HEMA za glutation.



**Slika 3.** Strukturna formula glutationa

Glutation ili  $\gamma$ -glutamyl-cisteil-glicin je tripeptid kemijske formule  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ , a sastoji se od tri aminokiseline: cisteina, glicina i glutaminske kiseline. Ima peptidnu vezu između amino skupine cisteina i karboksilne skupine glutaminske kiseline. Također služi kao antioksidans toksičnih međuprodukata, kao što su vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) ili nascentnog kisika (slobodni radikal).

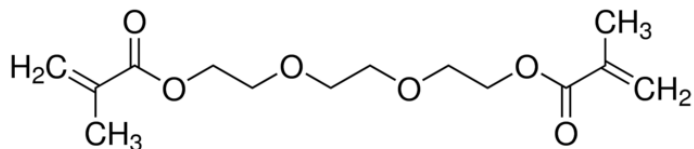


**Slika 4.** Oksidativni stres induciran djelovanjem HEMA (GST-glutation S-transferaza, GSSG-glutation disulfid, GPx-glutation peroksidaza, SOD-superoksid dismutaza) (6)

Samo genotoksično djelovanje započinje djelovanjem esteraza usne šupljine na metakrilatni monomer. Smatra se da je 2,3-epoksimetakrilatna kiselina nositelj genotoksičnog svojstva te je, prema tome, prekursor genotoksičnog djelovanja 2-hidroksietilmetakrilata. Metakrilatna kiselina, također, posjeduje genotoksična svojstva tako što stimulira oslobađanje faktora nekroze tumora b te interleukina-6 u makrofazima miševa (7).

## 1.2 TEGDMA

TEGDMA ili trietilenglikol-dimetakrilat jest monomerni ester kemijske formule  $C_{14}H_{22}O_6$  s molarnom masom od 286,324 g/mol i gustoćom od 1,092 g/cm<sup>3</sup> pri 25 °C. Riječ je o bezbojnoj nezapaljivoj tekućini. Temperatura vrelišta iznosi 155 °C (428,15 K), temperatura tališta -88°C (185,15 K), a temperatura zapaljenja iznad 110 °C (> 383,15K). Topiva je u acetonu, etanolu, eteru i petrolej-eteru, a vrlo dobro topiva u vodi (8).



Slika 5. Strukturna formula trietilen glikol dimetakrilata (TEGDMA)

U povijesti se, kao i 2-hidroksietil-metakrilat (HEMA), počeo koristiti u smjesi kojom se pravio hidrogel za pravljenje leća. Danas se koristi za estetsko obnavljanje strukture i funkcije zuba oštećenog karijesom, erozijom ili frakturom.

Svojim lučenjem iz zubnoga ljepila, koji je pod utjecajem esteraza usne šupljine, kao i HEMA, stvara citotoksičan učinak uzrokujući apoptozu, indukciju genotoksičnih učinaka te odgodu staničnih ciklusa. Poput HEMA, TEGDMA se može spojiti s glutationom i stvoriti glutation-TEGDMA adukte (time smanjujući koncentraciju glutationa u stanici), koji će svojim mehanizmom smanjiti potencijal za staničnu detoksikaciju, ali i stvarati slobodne reaktivne oblike kisika (npr. N-acetilcistein, askorbinsku kiselinu (vitamin C) ili tokoferol (vitamin E)). Oni će na kraju uzrokovati oksidativni stres u samoj stanici (9).

Kod oštećenja DNA, dokazano je da TEGDMA uzrokuje delecije baza u slijedu nasljednoga materijala, oštećuje kromosome te uzrokuje lomove u slijedu DNA, što na kraju dovodi do odgode staničnog ciklusa u G1 i G2/M fazi. TEGDMA, također, može oštetiti mitohondrije stanica (10)

### 1.3 Kvasci

Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi, a pripadaju carstvu gljiva zajedno s plijesnima i mesnatim gljivama. Ne posjeduju klorofil, što znači da ne posjeduju sposobnost fotosinteze pa hranu najčešće apsorbiraju iz okoline.

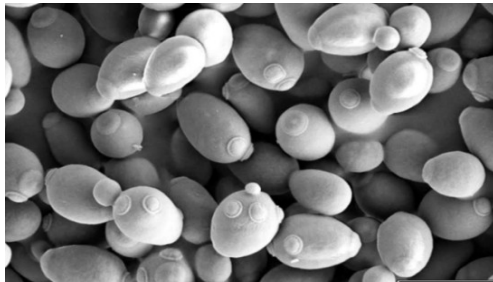
Na svijetu su prisutni više od sto milijuna godina, a danas je identificirano čak oko 1500 vrsta kvasaca (11). Stanica im je okrugla izdužena ili ovalna, a naziva se blastokonidija. Veličina joj varira od 5  $\mu\text{m}$  do 7  $\mu\text{m}$ . Stanica se sastoji od višeslojnog staničnoga zida, stanične membrane,

endoplazmatskoga retikuluma, jezgre, mitohondrija, glikogenskih zrnaca i vakuole. Stanični zid stanice daje njezin oblik i pridonosi čvrstoći, a čini oko 30% suhe težine blastokonidije. Čine ga ugljikohidrati (77-85%), nešto manje proteini (3-6%) i lipidi (2%). Od ugljikohidrata prisutni su β-glukani (48-60%), manani (20-23%) te hitin (0,6-2,7%). Sastav staničnoga zida mijenja se starenjem i mijenjanjem uvjeta rasta stanice. Stanični zid također sudjeluje u koloniziranju površina i prodiranja stanice u tkiva. Stanica može posjedovati i kapsulu, koja joj omogućava preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i jedan je od čimbenika patogenosti. Na površini stanice se nalaze fimbrije, koje stanici služe za pokretanje. Stanična membrana građena je od dvosloja fosfolipida (fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin) i glavna joj je uloga kontrole transporta tvari, odnosno odlučuje što ulazi, a što izlazi iz stanice. U njoj se nalaze hitin-sintetaza i manan-sintetaza, enzimi koji sudjeluju u stvaranju komponenti staničnoga zida. Također je jedno od ciljnih mjesta djelovanja antimikotika. Između staničnoga zida i stanične stijenke nalazi se tzv. periplazmatski prostor, u kojemu se nalaze proteini, kao što su fosfataze i invertaze. Ostatak organela (ribosomi, ER, citoplazmatski mikrotubuli, glikogenska zrnca i vakuola) nalaze se u citoplazmi. Glavni sastojak joj je voda, a sastoji se od organskih i anorganskih tvari (12).

Fakultativni su anaerobi, pa u prisutnosti dovoljne količine kisika provode proces disanja, pri čemu kao produkti metabolizma nastaju voda i ugljikov dioksid, a pri nedovoljnoj količini kisika energiju proizvode procesom fermentacije, pri čemu nastaju alkohol etanol te ugljikov dioksid. Većina se kvasaca razmnožava nespolno tj. pupanjem. Proces se odvija tako da na stanici roditelja izraste pup, jezgra se razdijeli pa jedan dio odlazi u pup koji se otkida kada dostigne veličinu osnovne stanice (13).

Zbog jednostavnog i brzog uzgoja, danas su kvasci vrlo često korišteni u industrijama, ponajviše u pekarskoj industriji (uloga proizvodnja ugljikova dioksida, koji diže tijesto, ali također pridonosi elastičnosti tijesta i razvoju ugodna okusa i mirisa tijesta), ali i kod fermentacije piva i vina, gdje se najčešće koristi vrsta *Saccharomyces*, i to rod *Saccharomyces cerevisiae*. Razlog njihove česte

korištenosti je njihovo podnošenje različitih uvjeta; od visokih i niskih temperatura (od 5 do 37 °C), niskih pH vrijednosti ili visokih koncentracija alkohola (14).



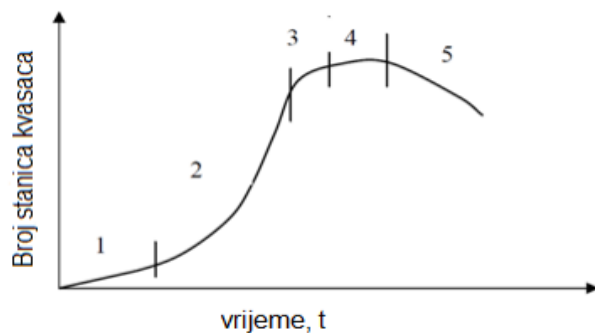
Slika 6. *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.3.1. Pekarski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*)

*Saccharomyces cerevisiae* ili pekarski kvasac jest najpoznatija vrsta iz roda *Saccharomyces*. Često se u literaturama može vidjeti da se kvasac i *Saccharomyces* koriste kao sinonimi. Stanica je svijetlo kremaste boje, u čiji sastav ulaze ugljik (48 %), kisik (31 %), dušik (8 %) i vodik (7 %). U tragovima se još mogu pronaći elementi poput kalija, kalcija, fosfora, magnezija te sumpora (15).

Hranidbena podloga za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sastoji se od šećera (koriste se glukoza, fruktoza, maltoza ili manozna), kvašćev ekstrakt i peptonska voda, a raste na temperaturi oko 37 °C. Za rast enzimatski pretvaraju šećer u etanol i ugljikov dioksid u anaerobnim uvjetima, a time se prilagođavaju šećerom bogatim supstratima i u mogućnosti su izvršiti alkoholnu fermentaciju. Sam rast kvasaca na određenom supstratu ide u pet faza:

1. faza prilagodbe
2. log faza (eksponencijalna faza)
3. post log faza
4. stacionarna faza
5. faza ugibanja



**Slika 7.** Krivlja rasta kvasaca

Kao što i samo ime kaže, u fazi prilagodbe dolazi do prilagodbe kvasca novonastalim uvjetima, pri čemu ne dolazi do rasta broja stanica, ali i dalje je prisutna metabolička aktivnost. U drugoj, eksponencijalnoj fazi, dolazi do dostizanja maksimalne brzine rasta stanica. U post log fazi dolazi do smanjenja brzine rasta, no broj stanice se i dalje eksponencijalno povećava s vremenom. Stacionarna faza je faza u kojoj jednak broj stanica ugiba i nastaje, odnosno nema promjene broja stanica, ali i dalje je prisutna metabolička aktivnost. Stacionarna faza nastaje kada je koncentracija limitirajućeg nutrijenta takva da ne može podržati maksimalnu brzinu rasta stanica. U zadnjoj fazi, fazi ugibanja, dolazi do očiglednog smanjenja broja stanica jer je brzina ugibanja brža od brzine razmnožavanja stanica (16).

Osim pekarske industrije i proizvodnje alkoholnih pića, pivski kvasac još nalazi primjenu u proizvodnji različitih metaboličkih produkata. To mogu biti neki enzimi, vitamini, kapsularni polisaharidi, karoteni, polihidrilni alkoholi, lipidi, glikolipidi, limunska kiselina, ugljikov dioksid te produkti dobiveni korištenjem rekombinantne DNK.



## 2 Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj monomera TEGDMA i HEMA, koji se ispiru iz ortodonskih adhezivnih sustava na prirast stanica te na metaboličku aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303. Prirast stanica kvasca pratio se promjenom broja stanica na početku i nakon 20 sati rasta na podlozi u koju je dodan monomer, dok se za određivanje metabolička aktivnosti koristio Live/Dead Yeast Viability Kit. Količina monomera dodana u podlogu s kvascem prethodno je eksperimentalno određena, a odgovara količini monomera koja se otpusti iz ortodontskih naprava tijekom 28 dana.

### **3 Materijali i metode**

#### **3.1 Materijali**

##### **3.1.1 Radni kvasac**

U ovom je istraživanju korišten soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303, koji je uzgojen na krutoj hranidbenoj podlozi, a za potrebe pokusa se submerzno uzgajao po *Scale-up* principu.

##### **3.1.2 Uređaji, laboratorijski pribor i kemikalije**

- HEMA, Sigma-Aldrich, SAD
- TEGDMA, Sigma-Aldrich, SAD
- Stakleno posuđe (tikvice od 250 mL, 500 mL, 1000 mL; čaše, epruvete)
- Automatske pipete, Eppendorf, Njemačka
- pH-metar MP 220, Mettler Toledo, EU
- Tehnička vaga PCB 1000-2, Kern-Sohn, Njemačka
- Analitička vaga Explorer, OHAUS, Švicarska
- Magnetska miješalica MR Hei Standard, Heidolph, Njemačka
- Fluorescentni mikroskop Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan
- Fluorimetar Tecan F200 Infinite multiplate reader, Tecan Austria GmbH, Austria
- Tresilica Unimax 1000, Heidolph, Njemačka
- Bürker-Türk-ova komorica
- Svjetlosni mikroskop Olympus BX40F; Olympus, Tokyo, Japan
- Koncentrirana otopina klorovodične kiseline (HCl), Merck

- Glukoza, Biolife, Italija
- Pepton, Liofilchem, Italija
- Kvašćev ekstrakt, Biolife, Italija
- LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, Thermo Fisher -Scientific, SAD
- Autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija
- Vorteks, Technokartell TK3S, Australija

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga, koja je korištena za uzgoj kvasaca u ovom istraživanju, je YPD podloga, a dolazi od engleskog termina Yeast Extract-Peptone-Dextrose. Uzgoj je submerzan pa je podloga tekuća i sadrži 2% glukoze, 2% peptonske vode te 1% kvašćevog ekstrakta. Također je potrebno praćenje pH vrijednosti otopine pH-metrom, koja bi trebala biti oko 5,5, upravo zbog toga što je to optimalna vrijednost pH za sam rast kvasaca. Ta se vrijednost postiže dodavanjem 1M HCl.

Nakon što se dobije bistra otopina, 10mL otopine prebacuje se u epruvete za prvu fazu rasta kvasaca, a ostatak u Erlenmeyerove tikvice za drugu fazu rasta. Otopine u Erlenmeyerovim tikvicama i epruветama stavljaju se u sterilizator, gdje se zagrijavaju 15 minuta na temperaturi od 121 °C.

### 3.2.2 Uzgoj kvasaca

Kvasci se uzgajaju u dvije faze, gdje u prvoj fazi rasta dolazi do rasta biomase kvasca u epruветama, dok u drugoj fazi dolazi do rasta biomase kvasaca na hranjivim podlogama u Erlenmeyerovim tikvicama. Kolonije se kvasaca, prethodno uzgojene na krutoj podlozi, sterilnom se ezom prenose u sterilnu hranjivu podlogu u epruветama, te uzgajaju na 24 sata, na temperaturi od

30 °C te brzini miješanja od 200 rpm. Nakon 24-satnog tretmana epruveta na tresilici, trebalo bi biti uočeno zamućenje podloga, što upućuje na umnažanje stanica kvasaca u hranidbenim podlogama epruveta.

Radni volumen bio je 200 mL hranjive podloge, i u svaku od tikvica dodane su po dvije epruvete koje sadrže prethodno umnoženu biomasu kvasaca.

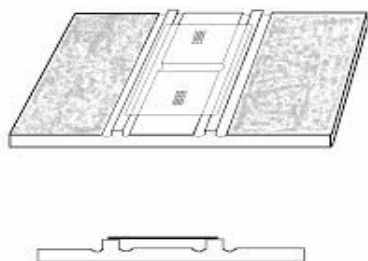
Monomer TEGDMA dodan je u količini 34,32 µg/200 mL podloge, a monomer HEMA dodano je 4 µL/200 mL podloge. Potom su tikvice začepljene vatom i podvrgnute tresilici na 20 sati, pri temperaturi od 30 °C i brzini od 200 rpm.

### 3.2.2.1 Brojanje kvasaca

Prebrojavanje stanica kvasaca provodi se neposredno nakon prebacivanja kvasaca iz epruvete u tikvice te po završetku inkubacije, i to pomoću Bürker-Türkove komorice na svjetlosnom mikroskopu. Bürker-Türkova komorica jest kvadratna mreža, koja sadrži 16 velikih kvadrata (4×4), od kojih svaki kvadrat sadrži 25 malih kvadrata (5×5). Kapljica se suspenzije razrijedi i prenese na komoricu te prekrije pokrovnim stakalcem, a potom, koristeći svjetlosni mikroskop s povećanjem od 400 puta, pronade mali kvadrat, unutar kojega su smještene stanice kvasaca. Brojenje se vrši barem 4 puta, a potom izračuna aritmetička sredina kao konačan broj stanica. Iz aritmetičke se sredine broja stanica u kvadratu može izračunati broj stanica kvasaca u mililitru suspenzije, a koristi se sljedeća formula:

$$\text{CFU/mL} = (16 \times n_{\text{sr}} / V) \times \text{rf},$$

gdje  $n_{\text{sr}}$  predstavlja aritmetičku vrijednost broja stanica,  $V$  volumen komorice ( $10^{-4}$  mL), a  $\text{rf}$  recipročnu vrijednost faktora razrjeđenja.



Slika 8: Bürker-Türk-ova komorica za brojanje stanica

### 3.2.3 Priprema pufera za ispiranje (GH-pufer)

Priprema jednog mililitra pufera za ispiranje, točnije GH-pufer, vršila se na način prikazan u tablici:

Za 1mL GH pufera	
	V/ $\mu$ L
0,1M HEPES (pH=7,2)	100
20%-tna otopina D-glukoze	100
Super čista voda (dd H <sub>2</sub> O)	800

### 3.2.4 Protokol određivanja metaboličke aktivnosti kvasaca

Za određivanje metaboličke aktivnosti kvasaca korišten je LIVE/DEAD Yeast Viability Kit-a, koji sadrži dvobojnu fluorescentnu boju FUN 1 i Calcofluor white (**s papira od prof**). Pri određivanju metaboličke aktivnosti u fluorescentnoj mikroskopiji ili nekoj drugoj instrumentalnoj metodi, FUN 1 proba, koja je klorirana cijaninska boja te prodire u stanične membrane kvasaca, može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s Calcofluor-om. Calcofluor white boji sve stanice, i žive i mrtve plavo-ljubičastom bojom.

FUN 1 proba koristi normalne endogene biokemijske mehanizme, koji su inače dobro očuvani u različitim vrstama kvasaca i gljiva. Promjena FUN 1 boje iz difuzne zelene fluorescentne

intracelularne mrlje u kompaktnu narančasto-crvenu intravakuolarnu strukturu zahtjeva i metaboličku aktivnost i integritet plazma membrane.

Stanice koje su metabolički aktivne imaju cilindrične crveno-fluorescentne strukture u vakuolama, tzv. CIVS (eng. cylindrical intravacuolar structures), dok mrtve ili stanice s malo/nimalo metaboličke aktivnosti imaju difuznu zeleno-žutu fluorescentnu intravakuolarnu strukturu. Stanice s neoštećenim membranama, a s malo ili bez metaboličke aktivnosti, imaju difuznu zelenu citoplazmatsku fluorescenciju.

#### 3.2.4.1 Priprema suspenzije i bojanje stanica kvasaca

Potrebno je uzgajati kvasac do kasne log faze ( $10^7$ - $10^8$  stanica/mL) u podlozi YPD. Potom se u mililitar pufera za ispiranje (GH-pufer) dodaje 50  $\mu$ L suspenzije kvasca (može se dodati i više od 50  $\mu$ L, ovisno o broju izbrojanih stanica). Dobivena se suspenzija zatim centrifugira u ultracentrifugi na  $10\ 000 \times g$  kroz 5 minuta, uklanja se supernatant, a talog resuspendira u mililitar pufera za ispiranje (GH-pufer).

U mililitar suspenzije kvasca se potom dodaje 1  $\mu$ L FUN1 i 5  $\mu$ L boje Calcofluor® white M2R, boje kojima će se bojati stanice kvasca te se inkubiraju u mračnome prostoru kroz 30 minuta na 30° C. Uzima se 5  $\mu$ L obojene suspenzije, koja se prethodno otpipetira na stakalce, prekriva se pokrovnim stakalcem te se fiksirani preparat promatra pod fluorescentnim mikroskopom, uz korištenje filtera odgovarajućih valnih duljina.

#### 3.2.4.2 Mikro-titarska analiza

Mikro-titarskoj se analizi podvrgavaju prethodno pripremljeni uzorci, a analiza je provedena na uređaju, fluorimetru, koji mjeri broj stanica kvasca neposredno nakon dodavanja monomera (na početku rasta stanica, odnosno nulto vrijeme) te nakon 20 sati (odnosno kraj eksponencijalne faze rasta). U svaku se jažicu otpipetira 200  $\mu$ L uzorka, a otpipetirani su uzorci s HEMA-om i TEGDMA-om te kontrolni uzorak, a kao slijepa proba korišten je GH-pufer i boje. Analiza se

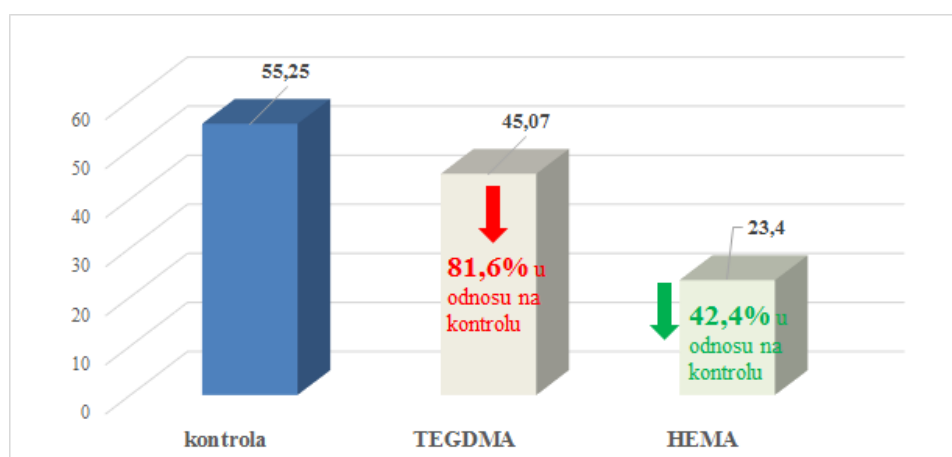
**Comment [k1]:** tu pronađite na papirima koje su to valne duljine i dopišite – Live/dead Yeast viability Kit

obavlja na valnim duljinama od 485 nm za eksitaciju i 620 nm za emiciju crvenih (metabolički inaktivnih) stanica te 485 nm za eksitaciju i 530 nm za emisiju zelenih (mrtvih) stanica. Potom se uspoređuje omjer crvenih i zelenih obojenih stanica kvasaca.

## 4 Rezultati

### 1. Određivanje vijabilnosti kvasca

Životnost (vijabilnost) kvasca određena je praćenjem broja stanica na početku rasta i nakon 20 h rasta na tekućoj podlozi u koju su dodani bilo TEGDMA ili HEMA. Vrijednosti su uspoređene s netretiranim (kontrolnim) uzorkom, a prikazane su slikom 9.



**Slika 9.** Vijabilnost kvasca praćena porastom broja stanica, izračunata u odnosu na početan broj stanica kvasca, kod kontrolnog i tretiranih uzoraka kvasca.

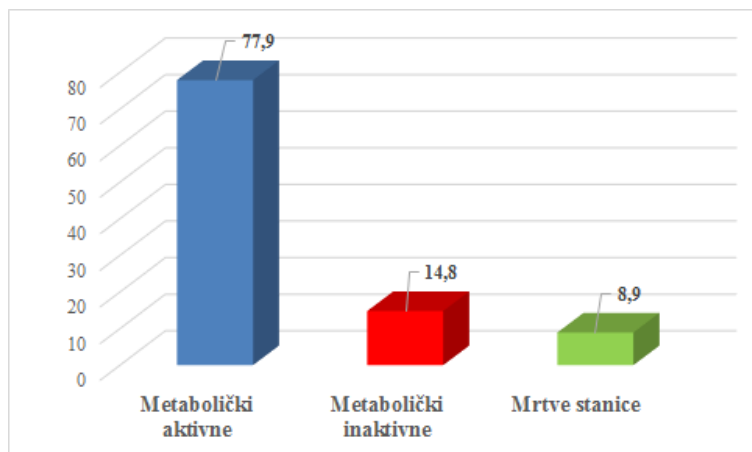
### 2. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti

U tablici 1 prikazane su vrijednosti s mikroskopskih preparata o broju različitih vrsta prebrojanih stanica tretiranih monomerom TEGDMA, udjel tih stanica u ukupnom broju stanica prikazan je slikom 10, dok je preklopljena mikroskopska slika tretiranih stanica kvasca, obojanih kombinacijom boja FUN 1 i Calcofluor white prikazana slikom 11. Tretman stanica monomerom TEGDMA rezultirao je postojanjem specifičnih polumjesečastih stanica čiji je udjel prikazan tablicom 2, a mikroskopski preparat slikom 12.

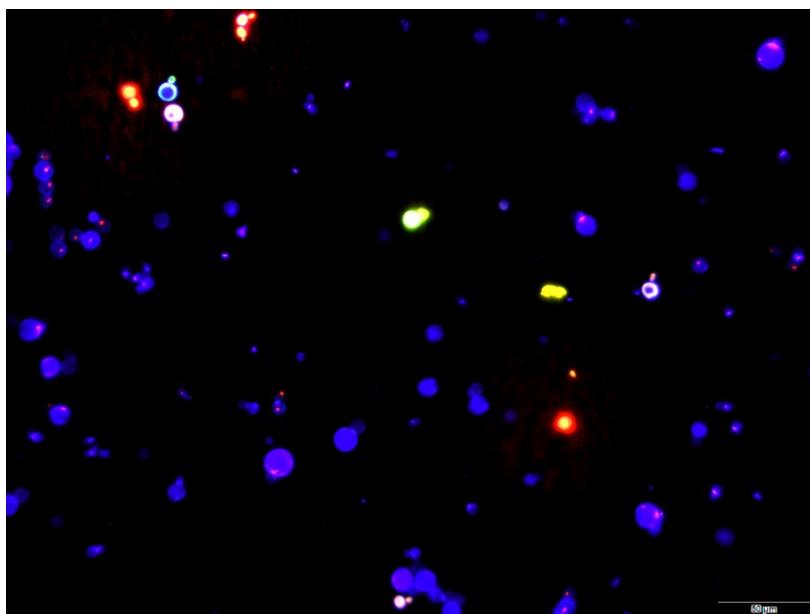


**Tablica 1:** Broj različitih stanica kvasaca dobiveni nakon tretmana monomerom TEGDMA.

<b>Plave stanice</b>	<b>Metabolički aktivne</b>	<b>Crvene stanice</b>	<b>Zelene stanice</b>
113	47	21	13
204	157	9	10
173	154	13	11
189	170	12	10
360	322	21	18
440	402	28	24
458	411	25	13
288	251	22	13
177	48	59	44
147	100	106	37
198	39	116	63
233	220	9	10



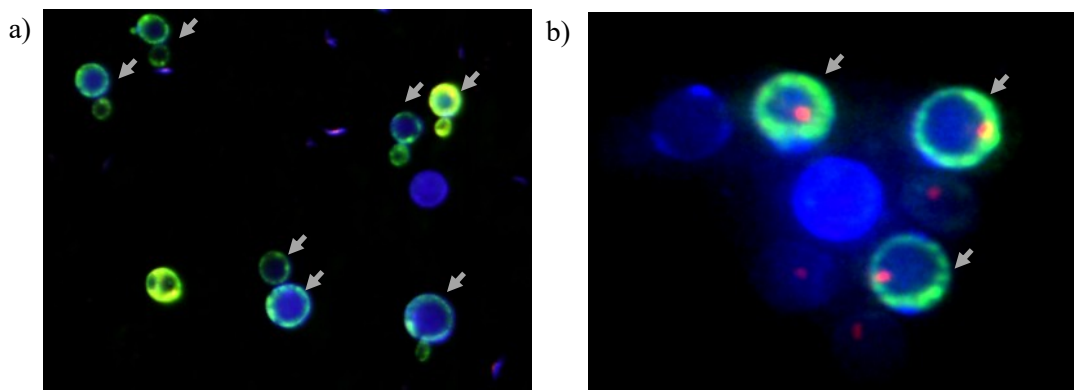
**Slika 10:** Grafički prikaz prosječnog postotka metabolički aktivnih, metabolički inaktivnih (crvenih) i mrtvih (zelenih) stanica kvasaca dobiveni nakon tretmana monomerom TEGDMA.



**Slika 11.** Preklopljena mikroskopska slika stanica kvasca tretiranim s TEGDMA, obojanih kombinacijom boja FUN 1 i Calcofluor white (P=400x)

**Tablica 2.** Udjel polumjesečastih stanica

Polumjesečaste stanice	
Raspon	Srednja vrijednost
4,9 – 20,5%	14,0%



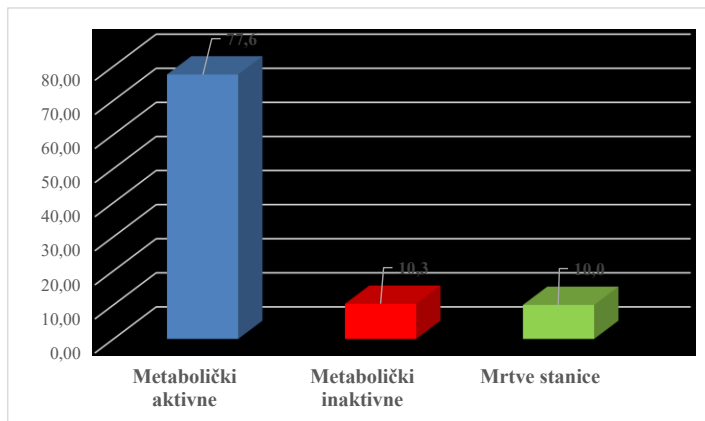
**Slika 12.** Mikroskopska slika stanica kvasca tretiranim s TEGDMA, obojanih kombinacijom boja FUN 1 i Calcofluor white (a) P=400x; b) P=1000x).

Strelicama su označene polumjesečaste stanice.

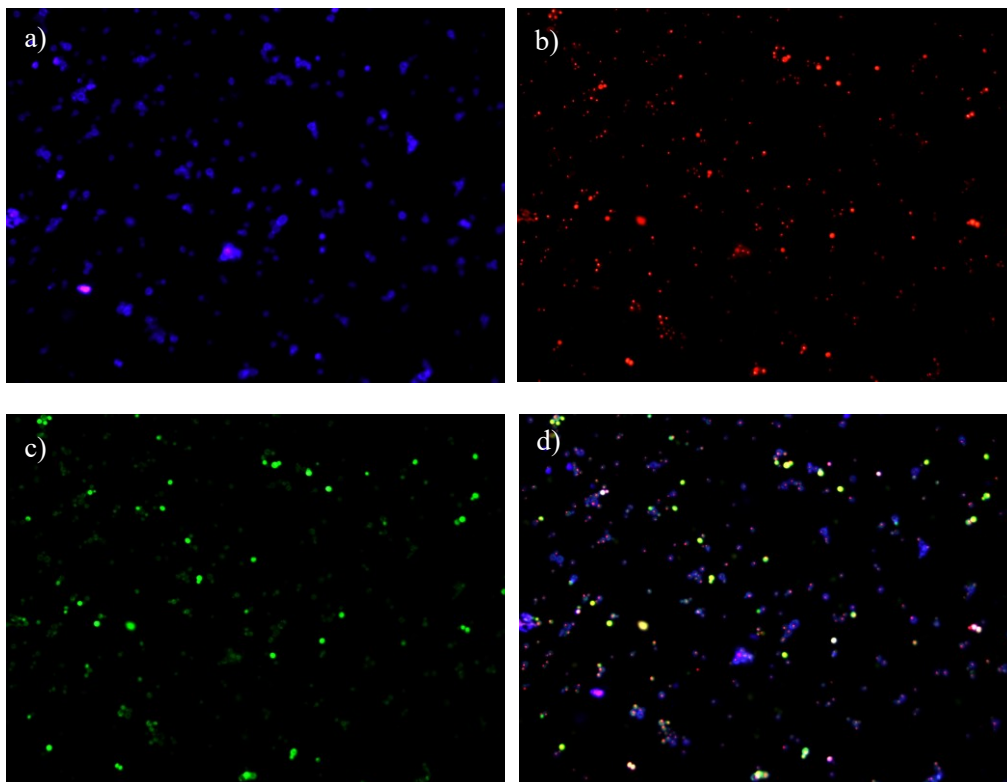
U tablici 3 prikazani su podaci s mikroskopskih preparata o broju različitih vrsta prebrojanih stanica kvasaca tretiranih monomerom HEMA, udjel tih stanica u ukupnom broju stanica prikazan je slikom 13, dok je a mikroskopska slika tretiranih stanica kvasca, obojanih bojama FUN 1 i Calcofluor white prikazana slikom 14.

**Tablica 3:** Broj različitih stanica kvasaca dobiveni nakon tretmana monomerom HEMA.

<b>Plave stanice</b>	<b>Metabolički aktivne</b>	<b>Crvene stanice</b>	<b>Zelene stanice</b>
37	32	5	5
100	80	10	10
154	124	16	14
193	170	12	14
166	131	17	14
318	263	25	25
358	308	25	28
27	12	5	6
15	15	0	0
58	30	11	11
66	43	7	4
63	39	11	11
106	86	6	10
138	113	11	9
142	121	18	14
154	134	12	8



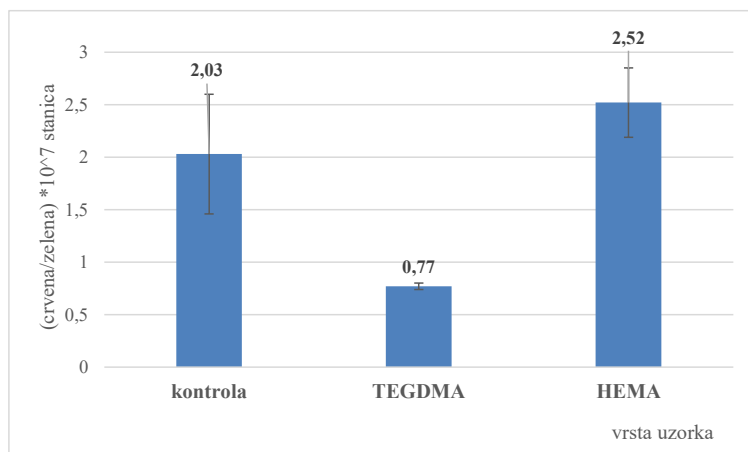
**Slika 13:** Grafički prikaz prosječnog postotka metabolički aktivnih, metabolički inaktivnih (crvenih) i mrtvih (zelenih) stanica kvasaca dobiveni nakon tretmana monomerom HEMA.



**Slika 14:** Mikroskopske slike stanica kvasaca tretirane s monomerom HEMA obojene s FUN-1 (crvena –b) i zelena – c)) i Calcoflour White (plava – a) i preklapljena slika d) (M=400x).

### 3. Flurimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti

Osim brojenjem obojenih stanica pod mikroskopom, metabolička se aktivnosti može odrediti flurometrom; mjernjem omjera crvene i zelene fluorescencije. Rezultati te analize prikazani su slikom 15.



**Slika 15:** Grafički prikaz flurimetrijskog određivanja metaboličke aktivnosti za netretirani uzorak (kontrolu) i stanice tretirane s monomerima TEGDMA i HEMA. Rezultat je prikazan kao omjer crvene i zelene fluorescencije fluorescentne boje FUN1.

## 5 Rasprava

### 5.1 Određivanje vijabilnosti kvasca

Uz određivanje metaboličke aktivnosti kvašćevih stanica, još je određivana i vijabilnost, odnosno životnost stanice kvasaca na početku rasta i nakon 20 sati rasta na tekućoj podlozi koja je tretirana monomerom TEGDMA, odnosno monomerom HEMA. Rezultati su uspoređeni s kontrolnim uzorkom, a prikazani su na slici 9.

Plavi stupac predstavlja kontrolni uzorak koji ne sadrži niti jedan od prethodno navedenih monomera. Nakon 20 sati rasta u tekućoj podlozi bez monomera, došlo je do povećanja broja stanica za 55,25 puta od početnog broja stanica. Stupac s crvenom strelicom predstavlja uzorak stanica koji je rastao 20 sati u tekućoj podlozi koja je tretirana monomerom TEGDMA te je došlo do povećanja broja stanica za 45,07 puta od početnog broja stanica, što je za 10,18 puta manje od povećanja broja stanica u kontrolnom uzorku. Zadnji stupac, stupac sa zelenom strelicom, predstavlja uzorak stanica koji je rastao u mediju koji je tretiran monomerom HEMA. U tom je mediju došlo do najslabijeg porasta broja stanica; 23,4 puta više od početnog broja stanica. Iz rezultata je potpuno vidljivo da monomeri TEGDMA i HEMA ili usporavaju rast stanica kvasca ili ubijaju njegove stanice. To je upravo moguće zbog njihovih citotoksičnih i genotoksičnih učinaka. Zajedničke su im karakteristike poremećaji ili odgode staničnog ciklusa, oštećivanje DNA (TEGDMA uzrokuje delecije baza, HEMA uzrokuje dvolančane lomove u strukturi DNA), uzrokovanje apoptoze stanica, a i spajanje s glutationom za stvaranje slobodnih kisikovih radikala koji će dovesti do oksidativnog šoka stanice (5,6).

No, također se vidi razlika u konačnom broju stanica u medijima tretiranim monomerima; u mediju tretiranom monomerom TEGDMA došlo je do većeg povećanja broja stanica u usporedbi s povećanjem broja stanica u mediju u kojemu se nalazi HEMA. To se vjerojatno može pripisati posebnom svojstvu HEMA-e koju monomer TEGDMA ne posjeduje, a to je indukcija autofagije stanice, odnosno autofagocitoze, a definira se kao prirodni destruktivni mehanizam za razgradnju

nepotrebnih ili disfunkcionalnih staničnih komponenti (17). Ta je karakteristika HEMA-e dokazana u istraživanju provedenom u listopadu 2015. godine na talijanskom Sveučilištu u Bologni, a istraživanje je predvodila Gabriella Teti i suradnici. Istraživanje je provedeno na humanim gingivalnim fibroblastima.

### 1. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti

Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti stanica kvasaca odrađeno je na način da se stanice kvasaca tretiraju LIVE/DEAD Yeast Viability Kit-om, a potom se rezultat bojanja mikroskopira na fluorescentnom mikroskopu.

Slika 14 prikazuje mikroskopske slike stanica kvasaca tretirane monomerom HEMA obojene s FUN-1 (crvena –b) i zelena – c)) i Calcoflour White (plava – a). Calcoflour White boja oboji sve stanice te se tako koristi za dobivanje ukupnog broja stanica, dok se FUN-1 boja koristi za razlikovanje stanica prema njihovoj metaboličkoj aktivnosti. Ukoliko je stanica metabolički aktivna, ona će tu boju u svojoj citoplazmi iz difuzno zeleno-žute boje promijeniti u crvenu boju koju vidimo kao cilindrične crveno-fluorescentne strukture u vakuolama, pa je stoga stanica na kraju plava s crvenom točkicom, kao na slici crvena-b. Mrtve stanice, kao zelene stanice na slici zelena-c, neće pretvarati FUN-1 boju u crvenu niti će stvarati cilindrične strukture u vakuolama pa fluoresciraju žarko žuto-zeleno. Kod živih stanica kvasaca, u kojima je došlo do oštećenja vakuola, nije došlo do stvaranja cilindričnih struktura jer se one upravo i stvaraju u vakuolama, no došlo je do pretvorbe FUN-1 boje iz žuto-zelene u crvenu (18). Stoga se žive, ali metabolički inaktivne stanice na fluorescentnom mikroskopu vide crveno, kao što je na slici crvena-b.

Iz slika 10 i 13 može se iščitati prosječan postotak metabolički aktivnih, metabolički inaktivnih i mrtvih stanica nakon njihova tretmana s monomerima TEGDMA-om, odnosno HEMA-om. Metaboličke aktivne stanice (plavi stupac) kod oba slučaja ima sličan iznos; kod tretmana s TEGDMA-om 77,9%, a s HEMA-om 77,6%. No, udio metabolički inaktivnih stanica (crveni stupci) je drugačiji, u prosjeku veći kod tretmana s monomerom TEGDMA. Zanimljivo je da kod



tretmana s HEMA-om, kako se to lijepo vidi na slici 14, gotovo sve metabolički inaktivne stanice (fluorescentno crvene; 14 b) su i mrtve stanice (fluorescentno zelene; 14 c), dok kod tretmana s TEGDMA to nije slučaj. Naime u tom se tretmanu na mikroskopskom preparatu uočavaju posebne polumjesečaste stanice, koje mogu činiti čak i više od 20% od ukupnog broja stanica (tablica 2; slika 12) i tu metabolički inaktivne nisu ujedno i mrtve stanice, te se udjeli tih vrsta stanica niti ne podudaraju. Postojanje difuznog zelenog obojenja, koje bi se nešto duže trebalo zadržati po rubovima, samo je prolazna faza prilikom procesiranja boje i trebala bi trajati najviše pola sata (citirano: Live/Dead Yeast Viability kit), a nakon toga bi kod metabolički aktivnih stanica trebale nastati vakuolarne CIVS strukture. U tretmanu s monomerom TEGDMA te su stanice izrazito debelih polumjesečastih rubova koji su postojani satima. No, zanimljivo je da su neke od takvih stanica metabolički aktivne, jer uz taj debeli polumjesečasti rub, one imaju i CIVS (slika 12b). U literaturi nema sličnih primjera, kao ni mogućeg objašnjenja za to.

## 2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti

Drugi dio određivanja metaboličke aktivnosti stanica kvasaca proveden je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-Goranske županije. Korišten je uređaj fluorometar koji očitava i crvenu i zelenu fluorescenciju dvobojne boje FUN1, a onda se rezultat te analize izražava omjerom crvene i zelene fluorescencije svih prisutnih stanica (Slika 15). (*literatura-prof. word met. aktivnost*).

Mjerena je metabolička aktivnost za netretirani uzorak (kontrolu) te stanica tretiranih monomerima TEGDMA-om i HEMA-om. Prema preporukama proizvođača, tijekom procesiranja FUN-1 boje i stvaranja CIVS-a povećava se omjer crvena/zelena fluorescencija, a svoj bi maksimum trebao dostići oko 45 minuta nakon dodatka u suspenziju stanica. Ta bi vrijednost trebala iznositi 1,5-2.

Kako je to vrijednost dobivena u netretiranom uzorku, on se može uzeti kao referentan. Kod uzorka tretiranog monomerom TEGDMA omjer iznosi 0,77, a kod uzorka tretiranog monomerom HEMA 2,52. Kod uzorka tretiranih monomerom TEGDMA omjer je znatno smanjen u odnosu na kontrolu, vjerojatno zbog viših vrijednosti zelene fluorescencije i duljeg postojanja zelene boje u

samim stanicama. Iako bi prema literaturnim navodima (5,6) oba monomera trebala slično utjecati na stanice (izazivajući apoptozu, oksidativni stres, poremećaj ili odgodu dijelova staničnog ciklusa, oštećenja molekule DNA), prema dobivenim rezultatima fluorimetrijskog određivanja (jer jedan povećava, a drugi smanjuje taj omjer) čini se da oni ipak djeluju drugačije, što će biti predmet nekog našeg budućeg istraživanja.

## 6 Zaključak

Na osnovi provedenog istraživanja može se zaključiti:

- oba monomera, i TEGDMA i HEMA, imaju negativan učinak i na metaboličku aktivnost i na vijabilnost stanica kvasca iz soja *Saccharomyces cerevisiae* W303.

- potencijal vijabilnosti je u oba tretmana smanjen, u usporedbi rasta broja stanica s kontrolnim uzrokom,

- HEMA monomer pokazuje veći potencijal narušavanja vijabilnosti stanica nego TEGDMA. Vjerojatni razlog tomu je što monomer HEMA, uz sva slična svojstva monomeru TEGDMA-e kojima oba monomera narušavaju vijabilnost stanica, ima sposobnost induciranja autofagije stanica, što nije slučaj kod TEGDMA-e.

- kod mikroskopskog određivanja metaboličke aktivnosti stanica, pokazano je da oba monomera stvaraju sličan udio metabolički aktivnih i mrtvih stanica, No, monomer HEMA stvara manji udio metabolički inaktivnih stanica, gdje su gotovo sve ujedno i mrtve stanice, što nije slučaj kod djelovanja TEGDMA-e kod kojega se udio mrtvih i metaboličkih inaktivnih stanica ne podudara.

- kod tretmana s TEGDMA se pojavljuju i posebne stanice sa zelenim polumjesečastim rubom, a neke su i takve stanice metabolički aktivne zbog prisustva CIVS-a. Taj se fenomen nije uspio objasniti iz različitih literatura i pokušat će se u budućnosti pomnije istražiti te objasniti.

## 7 Literatura

1. Inamitsu H., Okamoto K., Sakai E., Nishishita K., Murata H., Tsukuba T.; The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity; 2017 .
2. Sara Alizadehgharib, Anna-Karin Östberg, Ulf Dahlgren; Effects of the methacrylate/acrylate monomers HEMA, TEGDMA, DEGDA, and EMA on the immune system; 2017.
3. U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information; Pubchem, 2-hidroxyethyl methacrylate; pristupljeno 18.6.2019. Dostupno na <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Hydroxyethyl-methacrylate>
4. Wichterle O., Lim D.; Hydrophilic Gels for Biological Use, 1960.
5. Stephanie Krifka, Karl-Anton Hiller, Gianrico Spagnuolo, Anahid Jewett, Gottfried Schmalz i Helmut Schweiki; The influence of fluctuation on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), 2012.
6. M. Gallorini, A. Cataldi i V. Di Giacomo; HEMA-induced cytotoxicity: oxidative stress, genotoxicity and apoptosis, 2014.
7. Joanna Szczepanska, Tomasz Poplawski, Ewelina Synowiec, Elzbieta Pawlowska, Vezary J. Chojnacki. Jam Chojnacki i Janusz Blasiak; 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation, 2011.
8. . U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information; Pubchem, triethylene glycol dimethacrylate; pristupljeno 18.6.2019. Dostupno na <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triethylene-glycol-dimethacrylate>
9. H. Schweiki, G. Spagnuolo, G. Schmalz; Genetic and Cellular Toxicology of Dental Resin Monomers, 2006.
10. Saurabh K. Gupta, Payal Saxena, Vandana A. Pant i Aditya B. Pant; Release and toxicity of dental resin composite, 2012.

11. Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell i Teun Boekhout; Yeasts, a Taxonomic Study. Vol. 3, 2011
12. Emilija Mlinarić-Missoni; Medicinska bakteriologija i mikologija, 1995.
13. Duraković S.; Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996., str. 231-232
14. Grba Slobodan.; Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji, Zagreb: Plejda, 2010., str 238-244
15. Vrsalović-Presečki A.; Studij procesa pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, Magistarski rad, Zagreb, 2003.; pristupljeno 22.6.2019.; dostupno na [https://bib.irb.hr/datoteka/141973.Ana\\_Vrsalovi\\_Preseki\\_magistarski\\_rad.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/141973.Ana_Vrsalovi_Preseki_magistarski_rad.pdf)
16. B. Andričić: Vježbe iz biotehnoških procesa, Kemijsko tehnološki fakultet, Split, 2006.; pristupljeno 23.6.2019., dostupno na [http://tkojetko.irb.hr/documents/16691\\_2126.pdf](http://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2126.pdf)
17. Gabriella Teti, Giovanna Orsini, Viviana Salvatore, Stefano Focaroli, Maria X. Mazzotti, Alessandra Ruggeri, Monica Mattioli-Belmonte i Mirella Falconi; HEMA but not TEGDMA induces autophagy in human gingival fibroblasts, Italija, 2015.
18. Brandin D. Essary i Pamela A. Marshall; Assessment of FUN-1 vital dye staining: Yeast with a block in the vacuolar sorting pathway have impaired ability to form CIVS when stained with FUN-1 fluorescent dye, 2009

## **ŽIVOTOPIS**

### **Osobni podaci:**

Ime i prezime: Domagoj Sabadi

Datum rođenja: 05. svibnja 1997.

Mjesto rođenja: Osijek

Državljanstvo: Hrvatsko

Narodnost: Hrvat

Adresa: Ulica grada Vukovara 101, Čepin 31431

Telefon: +385 95 392 39 93

E-mail: domagoj.sabadi3@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2004. – 2012. Osnovna škola Miroslava Krleže, Čepin

2012. – 2016. I gimnazija Osijek, opći smjer

2016. – 2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

### **Vještine:**

Strani jezici: engleski i njemački jezik