

Učinak Bis-GMA i njenog raspadnog produkta bis-fenola A koji se ispiru iz ortodonskih adhezivnih sustava na metaboličku aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Radojković, Dinko

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:461331>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dinko Radojković

**UČINAK BIS-GMA I NJENOG RASPADNOG PRODUKTA BIS-
FENOLA A KOJI SE ISPIRU IZ ORTODONTSKIH
ADHEZIVNIH SUSTAVA NA METABOLIČKU AKTIVNOST
KVASACA *Saccharomyces cerevisiae***

Završni rad

Rijeka, 2019

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dinko Radojković

**UČINAK BIS-GMA I NJENOG RASPADNOG PRODUKTA BIS-
FENOLA A KOJI SE ISPIRU IZ ORTODONTSKIH
ADHEZIVNIH SUSTAVA NA METABOLIČKU AKTIVNOST
KVASACA *Saccharomyces cerevisiae***

Završni rad

Rijeka, 2019

ZAHVALE

- *Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici Izv.prof.dr. sc. Gordani Čanadi Jurešić na prenesenom znanju, izrazitom strpljenju i vodstvu pri izradi ovoga završnog rada. Hvala Vam na izdvojenom vremenu te korisnim savjetima i potpori koji su mi omogućili najbolju realizaciju završnog rada.*
- *Zahvaljujem se Dr. sc. Boženi Ćurko-Cofek i mag.sanit.ing Nermini Mumiši na utrošenom vremenu i pomoći kod analize eksperimentalnih rezultata.*
- *Također, zahvaljujem se svim profesorima i asistentima sa zavoda za medicinsku kemiju i biokemiju na suradnji i ugodnom boravku pri izradi praktičnog dijela završnoga rada.*
- *Na kraju se zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama koji su mi bili podrška i vjerovali u mene u svakom trenutku tokom studiranja i pisanja završnog rada.*

D.R

Mentorica rada: Izv.prof.dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić, dipl.inž

Završni rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom

u sastavu:

1. _____

2. _____

3. Izv.prof. dr. sc. Gordana Čanadi Jurešić

Rad ima 31 stranicu, 12 slika, 1 tablicu i 17 literaturnih navoda.

Sažetak

Bisfenol A je kemijski spoj koji se uglavnom koristi za proizvodnju polikarbonatne plastike i poliepoksida. Danas Bisfenol A zauzima sve više mjesta u kliničkoj stomatologiji gdje se koristi za proizvodnju dentalnih kompozita i adheziva. 30.-ih godina prošloga stoljeća dokazano je da bisfenol A ima estrogena svojstva te je izražena velika zabrinutost oko njegove upotrebe u potrošačkim proizvodima, posebice dentalnim preparatima s kojima je čovjek u direktnom kontaktu.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi na koji način dentalni adheziv Bis – GMA i njegov raspadni produkt Bisfenol A djeluju na metabolizam stanica kvasaca. Stanice kvasca na kojima se provodilo istraživanje su iz roda *Saccharomyces*, vrsta *cerevisiae* tj. pivski kvasac. Ovaj jednostanični eukariot odlikuje jednostavan životni ciklus i kratko generacijsko vrijeme. Budući da kvasci dijele veće sličnosti s životinjama nego biljkama odličan su model za ljudske stanice. Djelovanje Bisfenol A i Bis – GMA na metaboličku aktivnost kvasaca praćena je bojanjem stanica kombinacijom boja FUN-1 i Calcoflour White te analizom fluorescentnom mikroskopijom i fluorimetrom. Rezultati dobiveni fluorescentnom mikroskopijom pokazuju da Bisfenol A i Bis – GMA djeluju na stanice kvasaca, uzrokujući smrt stanice ili smanjenje metaboličke aktivnosti. Ti su rezultati potvrđeni i fluorimetrijskim istraživanjem jer su BPA i Bis – GMA uzrokovali zamjetno smanjenje omjera crvene i zelene fluorescencije u usporedbi s kontrolnim vrijednostima.

Ključne riječi: Kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, Bisfenol A, Bis - GMA

Summary

Bisphenol A is a chemical compound mainly used for the production of polycarbonate plastics and polyepoxides. Today, Bisphenol A is more and more involved in clinical dentistry where it's used for dental composite and adhesive production. In the 1930s, it was discovered that bisphenol A possesses estrogenic properties, and that discovery caused a great concern when it comes to using it in different products; especially in dental preparations which usually come in a direct contact with people.

The aim of this study was to determine how the dental adhesive Bis-GMA and its breakdown product Bisphenol A affect the yeast's metabolism. The yeast used in this study were from the genus *Saccharomyces*, a species of *cerevisiae*, also known as brewer's yeast. This single-celled eukaryote is characterized by a simple life cycle and short generation time. Because of their greater similarity to animals than plants, they are a great model for human cells.

The effect of Bisphenol-A and Bis-GMA on the yeast metabolic activity was monitored by cell staining using the combination of FUN-1 and Calcofluor White stains and then analyzing it by using both fluorescence microscopy and fluorimeter analysis.

The results given by fluorescence microscopy show that Bisphenol A and Bis-GMA affect the yeast cells; by killing the cells or by reducing their metabolic activity. These results were also confirmed by fluorimetric studies because BPA and Bis - GMA reduced the noticeable decrease in red and green fluorescence ratios compared to control values.

Key words: Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Bisphenol A, Bis-GMA

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Bis-GMA	1
1.2. Bisfenol A	3
1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva	3
1.2.2. Biološki učinci BPA	4
1.3. Kvasci	5
1.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.3.2. Građa i funkcija stanice kvasca	8
2. Cilj istraživanja	10
3. Materijali i metode	11
3.1. Materijali	11
3.2. Metode	12
3.2.1. Priprema hranjive podloge	12
3.2.2. Uzgoj kvasca	12
3.2.2.1. Određivanje broja stanica kvasca	13
3.2.3. Određivanje metaboličke aktivnosti kvasca	14
3.2.3.1. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca	14
3.2.3.2. Fluorometrijsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca	15

4. Rezultati	18
4.1. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca	18
4.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca.....	22
5. Rasprava	23
5.1. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca	23
5.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca.....	26
6. Zaključci	27
7. Literatura	28
8. Životopis	31

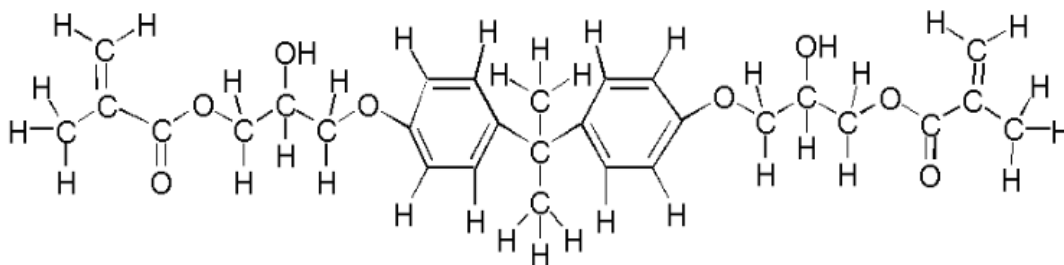
1. Uvod

Unatrag nekoliko godina polimerni spojevi koji se ispuštaju iz različitih predmeta s kojima je čovjek u izravnom doticaju postaju predmeti rasprave. Jedan od spojeva kojem je posvećeno puno pažnje je bisfenol A (BPA). Danas se BPA poglavito nalazi u polikarbonatima i epoksismolama, no sve je više prisutan i u ambalažama za vodu i hranu, opremi za djecu, bijeloj tehnici, elektroničkoj opremi, bojama te u ambalaži za konzerviranje hrane i pića. U drugoj polovici dvadesetoga stoljeća ispitivano je djelovanje BPA na ljudski organizam, životinje i okoliš. Krajem dvadesetog stoljeća dokazan je negativan utjecaj na zdravlje ljudi, a 1996. godine proglašen supstancom koja je opasna za ljudsko zdravlje. Dokazano je da BPA negativno utječe na hormonalnu ravnotežu ljudi, životinje, fetuse, novorođenčad i malu djecu [1]. BPA može djelovati na normalnu raspodjelu kromosoma, te kod ljudi, kao posljedica toga dolazi do poremećaja, koji su glavni razlog za pobačaje i genetske defekte, kao što je to Downov sindrom. Proizvodnja BPA je započela je 1957. god. u SAD-u, a 2001. god. globalna proizvodnja BPA procjenjuje se na oko 2,5 milijuna tona [2].

1.1. Bis-GMA

50-ih godina 20. stoljeća njemački su istraživači zabilježili rezultate da metakrilatni nadomjesci pokazuju povećanu promjenu boje i propadanja zuba te reakcija zubne pulpe. Ove početne nuspojave pripisane su polimerizacijskom skupljanju i ispiranju monomera. Da bi se smanjilo polimerizacijsko skupljanje, poboljšala čvrstoća i ljepljivost istraživači su dodali inertne čestice punila metakrilatnoj smoli te je istražena mogućnost korištenja i epoksidnih smola (diglicidil eter bisfenola A). Tijekom te polimerizacije metilne metakrilatne skupine spoje se s krajnjim skupinama epoksidne smole, a epoksidna je smola pretvorena u dimetakrilat. Eksperimentalni

ishod bio je uspješan i rezultirao je novom smolom zvanom **Glicidil MetAkrilat Bisfenol A** ili Bis-GMA [3]. Zubni kompoziti na bazi metakrilata prvi put su se počeli primjenjivati u stomatologiji šezdesetih godina te se široko koriste u dentalnoj medicini zbog svojih prednosti, kao što su izvrsna estetska svojstva i lako rukovanje. Obično se zubni kompoziti sastoje od smolne matrice na bazi metakrilata, sustava za fotoinicijaciju i punila za vezanje silana (silane coupling agent-treated fillers). Uobičajeno korištena matrica za smolu je smjesa dva ili više dimetakrilatnih monomera. Na izvedbu zubnih matrica snažan utjecaj ima sastav smolne matrice. Bis-GMA je dominantni monomer koji se koristi u komercijalnim zubnim kompozitima, a njegova dominacija pripisuje se niskom volumetrijskom skupljanju, visokoj reaktivnosti, dobrim mehaničkim svojstvima, niskoj hlapljivosti i maloj difuznosti u tkivima. Međutim, zbog svog estrogenog potencijala zubni kompoziti bazirani na Bis-GMA, danas predstavljaju veliki problem zbog masovnog razvitka „dentalne medicinske industrije“. Naime, Bis-GMA je sintetiziran iz bisfenola A (BPA) i glicidil-metakrilata (GMA), a BPA je vrsta spoja kojem je 90-ih godina prošloga stoljeća otkriveno da ometa endokrini sustav i da može uzrokovati brojne zdravstvene probleme (muške reproduktivne abnormalnosti, oštećenje spermatogeneze, veliku vjerojatnost pojavnosti bolesti srca, dijabetes...). [4]



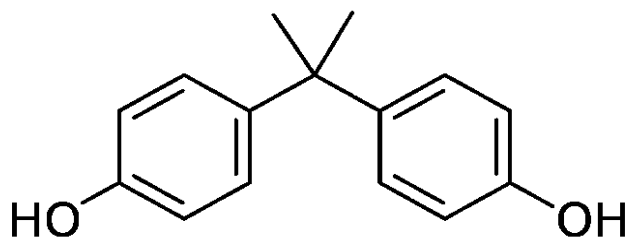
Slika 1. Strukturna formula monomera Bis – GMA. Izvor:

<http://nersp.nerdc.ufl.edu/~soderho/E01.htm>

1.2. Bisfenol A

1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva

Bisfenol A (BPA) (4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan) je kemijski spoj molekulske težine 228,29 g/cm³. Bijela je, kristalna čvrsta tvar s točkom taljenja 156 °C i vrelištem 220 °C (pri tlaku od 5 hPa). Koeficijent raspodjele za BPA izražen u logaritamskom obliku iznosi 3,32 (log P = 3,32), što pokazuje njegovu dobru topljivost u mastima i malu topljivost u vodi (oko 200 mg/dm³ na 25 °C). BPA pripada skupini fenola, koji imaju hidroksilni ostatak izravno vezan za aromatski prsten. Prisutnost hidroksilnih skupina u BPA određuje njegovu dobru reaktivnost. Slično drugim fenolima, BPA se može pretvoriti u etere, estere i soli. Štoviše, BPA prolazi elektrofilnu supstitucija kao što je nitriranje, sulfoniranje ili alkiliranje. To je kemijska supstanca visoke proizvodnje te se široko koristi u proizvodnji polikarbonata i epoksidnih smola i kao aditiv u polivinil kloridu. BPA je izumio ruski kemičar Aleksandr Dianin 1891. god., no njegovu je sintezu prvi put izvijestio Theodor Zincke u Njemačkoj 1905. god. Dobiven je kondenzacijom fenola s acetonom u prisutnosti jako kisele smole za ionsku izmjenu, u obliku gela, kao katalizatora [5].



Slika 2. Strukturna formula Bisfenola A.

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/BPA_controversy

1.2.2. Biološki učinci BPA

Korisnost BPA u proizvodnji plastike postala je vidljiva sredinom 20. stoljeća. Polikarbonat se klasično sintetizira polimerizacijom BPA monomera u reakciji s karbonil dikloridom (fosgenom) [6]. BPA je jednostavan za proizvodnju, također je lagan, trajan i vrlo izdržljiv. Zbog svojih izvanrednih svojstava BPA se u obliku polikarbonata nalazi u mnoštvu uobičajenih proizvoda kao što su voda, mlijeko i dječje bočice, naočale, sportska zaštitna oprema, kao i u medicinskim i stomatološkim adhezivnim preparatima. Kao epoksidna smola, BPA se uglavnom koristi za poravnavanje unutrašnjosti limenki hrane i zaštitu od njihovog sadržaja. BPA se također nalazi u termalnom papiru iz računa za blagajne, gdje su otkrivene visoke razine slobodnog BPA [7]. Dugi niz godina BPA se tretirala kao neutralna prema ljudskom zdravlju. Međutim, otkrivanje BPA u prirodnom okruženju, u vodi za piće i u prehrambenim proizvodima (od 1990.) izazvalo je interes mnogih istraživača i poticanje brojnih istraživanja. Gotovo u isto vrijeme ustanovljen je i negativan učinak ovog spoja na ljudsko zdravlje. Stoga je Europska komisija 1996. godine BPA klasificirala kao tvar vanjskog podrijetla s štetnim učinkom na ljudsko zdravlje. Brojne toksikološke i biokemijske studije potvrdile su da BPA ima estrogena svojstva i agonistički učinak prema estrogenskom receptoru. U novijim istraživanjima BPA klasificiran je kao uzročnik hormonske neravnoteže u ljudi i životinja koja uzrokuje poremećaj u ksenoobiozi. Dokazano je da BPA ima estrogenu aktivnost čak i pri koncentracijama ispod 1 ng/L. Učinci izloženosti BPA mogu biti posebno štetni za fetus, dojenčad i malu djecu jer kontakt s BPA u toj dobi može dovesti do nepovratnih promjena koje se pojavljuju i nakon dugo vremena [2].



Slika 3. Primjeri uobičajenih izvora Bisfenola A

izvor: https://www.researchgate.net/figure/Common-sources-of-bisphenol-A-Credits-Thinkstockcom_fig2_287646619

1.3. Kvasci

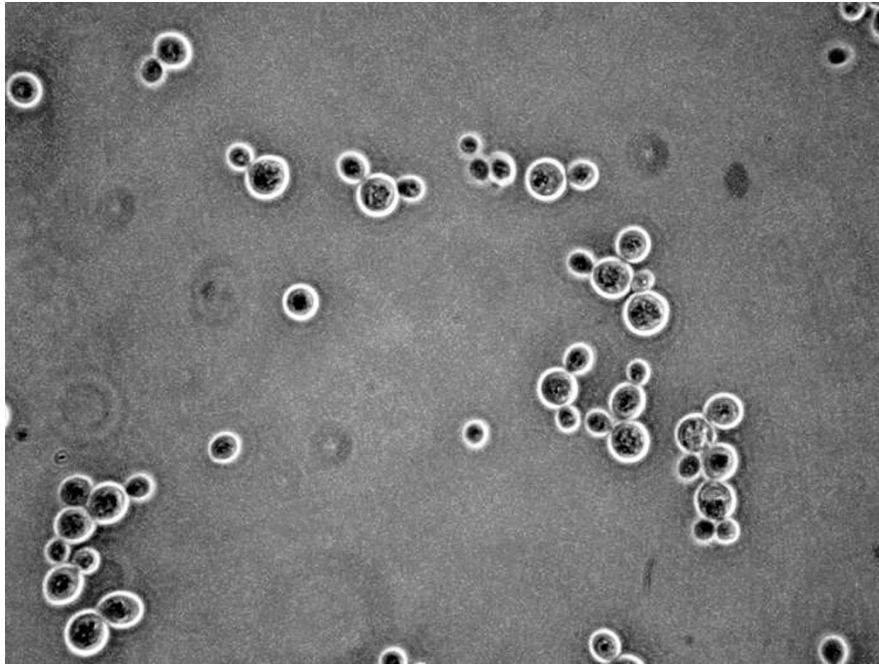
Kvasci su jednostanične gljive čija stanica ima okrugli ili ovalni oblik promjera 3 do 15 μm . Najčešće se razmnožavaju pupanjem tj. nesporogeno, međutim neke vrste produciraju pupove koji se uobičajno ne razdvajaju već se izdužuju nastavljajući proces pupanja pri čemu se stvaraju lanci izduženih blastokonidija koje se nazivaju pseudohifama. U sporogene kvasce ubrajaju se vrste koje spolnim razmnožavanjem stvaraju askuse. Kvasci tvore kolonije koje su mekane, neprozirne, bež boje, a veličina im je 1-3 mm. Većina kvasaca uspješno raste uz prisustvo jednostavnih izvora dušika i ugljikohidrata. Blastokondije su obavijene krutom višeslojnom staničnom stijenkom na koju se nadovezuje stanična membrana, a u citoplazmi blastokonidije nalaze se brojni organeli: jezgra, Golgijev aparat, transportne vezikule, vakuole, endoplazmatski retikulum, mitohondriji, glikogenska zrnca i peroksisomi [8].

Danas niži eukarioti, kao što su kvasci, pogodni su organizmi za proučavanje osnovnih procesa u eukariotskim stanicama. Prednost kvasaca u odnosu na više eukariote je jednostavan uzgoj i kratko generacijsko vrijeme, a pogodni su za istraživanja na području molekularne i klasične genetike. Spoznaja da su kvasci više povezani s životinjama nego biljkama čini ih prikladnim modelom za ljudske stanice [9].

1.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac koji je najbliže povezan s čovječanstvom, *Saccharomyces cerevisiae* ili pivski kvasac, odavno se koristi za vrenje, destilaciju alkohola, proizvodnju vina, te veliku važnost ima u pekarskoj industriji. To je daleko najviše proučavana i najbolje shvaćena vrsta kvasca i važan modelni sustav za temeljna istraživanja biologije eukariotske stanice. *Saccharomyces* je predstavnik askosporogenih kvasaca i povijesno je ljudima najpoznatiji mikroorganizam. Vrsta je porodice *Saccharomycetaceae* i subporodice *Saccharomycetoideae*, koje su okarakterizirane kao jednostanične gljive koje se vegetativno reproduciraju multilateralim pupanjem i spolno pomoću askospora. Vegetativne su stanice ovalne, jajolike ili cilindrične, a izgledaju svijetlo kremasto poput maslaca, dok je površina glatka i ravna [10]. Najznačajnija fiziološka karakteristika *Saccharomyces spp.* je njihova sposobnost za snažnu anaerobnu ili semianaerobnu fermentaciju jednog ili više šećera za proizvodnju etanola i CO₂. Za uzgoj *S. cerevisiae* potrebne su velike količine šećera, kvašćev ekstrakt i pepton. Šećeri koji se koriste za rast su D-glukoza, D-fruktoza, D-manoza i D-maltoza. Većina sojeva *Saccharomyces* može rasti na D-galaktozi u aerobnim ili anaerobnim uvjetima, međutim, ni jedan soj ne koristi laktozu, pentozu, alditole ni citrat kao izvore ugljika. Optimalna temperatura rasta kvasca *S. cerevisiae* je 37 °C, ali često mogu rasti i na temperaturu 40 – 42 °C [11].

Saccharomyces cerevisiae sadrži debelu staničnu stijenku, a srednja veličina stanice iznosi 5 – 10 μm , a veličina stanice će ovisiti o samoj dobi kvasca. *S. cerevisiae* čuva status eukariotske stanice činjenicom da su sastavni dio njegove stanične strukture makromolekule slične onima koje pronalazimo u stanicama drugih viših eukariota i sisavaca [12]



Slika 4. Prikaz stanica kvasaca iz roda *Saccharomyces cerevisiae* snimljena digitalnim mikroskopom (x1000).

izvor: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/microscopy>

1.3.2. Građa i funkcija stanice kvasca

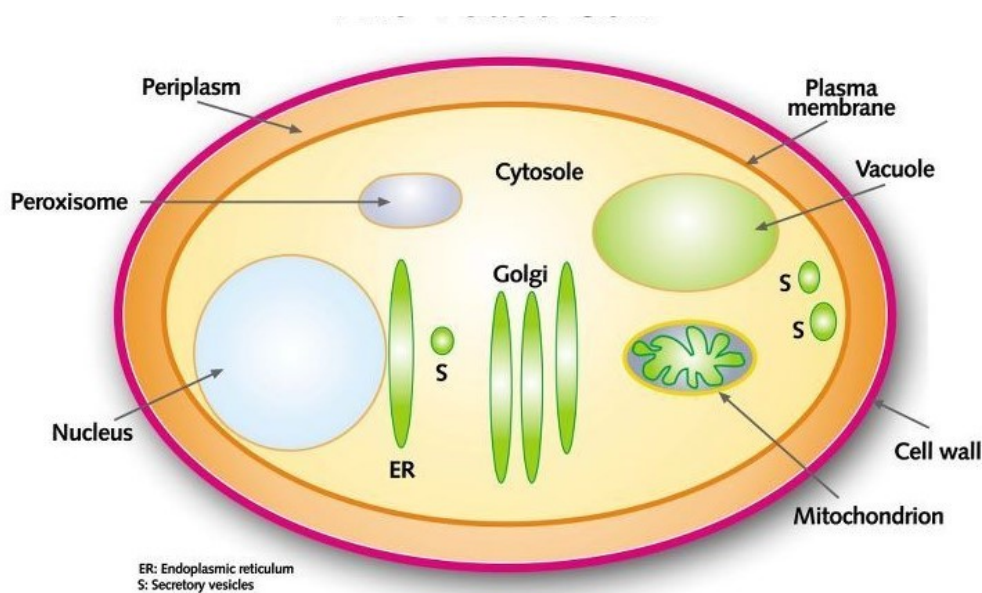
Ovojnica stanica u *S. cerevisiae* igra glavnu ulogu u kontroli osmotskih i propusnih svojstava stanice, a zauzima oko 15% ukupnog volumena stanice. Ima važnu ulogu u prijenosu tvari između stanice i okoline, te stanici daje oblik i čvrstoću.

Stanična stijenka je krute strukture te čini oko 25% ukupne suhe mase stanice. Sastoji se od četiri vrste makromolekula: visoko glikoziliranih glikoproteina ("manoproteina"), β -(1,6)-glukana, β -(1,3)-glukana i hitina. Sastav stanične stijenke podložan je varijacijama koji će ovisiti i uvjetima rasta. Djelovanjem litičkih enzima na staničnu stijenku može doći do njenog potpunog uklanjanja bez oštećenja vitalnosti stanice i drugih staničnih funkcija. Stanice koje ne sadrže staničnu stijenku nazivaju se sferoplasti. Stanica ima sposobnost regeneracije stanične stijenke što je korisno za proučavanje aspekata biosinteze stanične stijenke. Sferoplasti su podložni intergenskim i intragenskim spajanjem stanica, pri čemu nastaju hibridi koji su korisni u genetskim istraživanjima i posjeduju visoki biotehnološki potencijal.

Stanična membrana debljine je oko 7,5 nm, s povremenim izdancima koji strše u citoplazmu. Kao i kod drugih bioloških membrana možemo ju definirati kao lipidni dvosloj u kojem se nalaze proteini koji služe kao fiksatori citoskeleta, sadrže enzime za sintezu stanične stijenke, ali ima i važnu ulogu u prijenosu signala i transportu. Lipidni dvosloj uglavnom sadrži fosfolipide, poglavito fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin i sterole od kojih su najznačajniji ergosterol i zimosterol. Ovisno o uvjetima rasta, stanična membrana se mijenja funkcionalno i strukturno. Jedna od glavnih funkcija plazma membrane je: zaštita stanice, biosinteza stanične stijenke, egzocitoza i endocitoza, regulacija osmotskog tlaka, a i selektivna je barijera za propusnost različitih spojeva koji ulazi i izlaze iz stanice.

Prostor koji se nalazi između stanične stijenke i stanične membrane naziva se periplazmatski prostor. U periplazmatskom prostoru nalaze se različite vrste proteina koji ne mogu izaći kroz staničnu stijenku zbog njene karakteristične fiziološke građe. Jedni od tih proteina su fosfataze i invertaze, one kataboliziraju supstrate koji ne mogu proći kroz staničnu membranu.

Citoplazma je prostor u kojem se događa većina unutarstanične aktivnosti i prometa. To je vodena, koloidna tekućina kojoj pH iznosi 5,2, a u njoj se nalaze dobro topive makromolekule kao što su proteini, glikogen itd. Veće makromolekule kao što su ribosomi, proteasomi ili lipidne čestice nalaze se suspendirane u citoplazmi. U citoplazmi se nalaze glikolitički enzimi, kompleksi za sintezu masnih kiselina, te komponente i enzimi za sintezu proteina. Tu su i komponente zadužene za cjelovitost stanice – tvari koje formiraju i kontroliraju citoskeletnu konstrukciju [12].



Slika 5. Prikaz strukture stanice kvasca.

Izvor: https://winesignofindia.wordpress.com/2012/02/18/basic-yeast-morphology/376408_10150413395336137_370193936136_8452045_1047023528_n/

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je odrediti kako dentalni adheziv Bis-GMA i njegov raspadni produkt Bisfenol A (BPA) djeluju na stanicu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W303. Ispituje se utjecaj na prirast stanica kvasca (razlikom u broju stanica na početku i 20 sati nakon dodatka navedenog adheziva i njegovog raspadnog produkta u hranjivi medij) te na metaboličku aktivnost. Metabolička se aktivnost ispituje mikroskopski i fluorimetrijski, bojanjem stanica fluorescentnim bojama (FUN 1 i Calcofluor White M2R).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

- 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-Scientific, SAD
- Autoklav za sterilizaciju, CertoClav, Austrija
- Vorteks, Technokartell TK3S, Australija
- BisA, Sigma-Aldrich, SAD
- Bis-GMA, Sigma-Aldrich, SAD

3.2. Metode

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Hranjiva podloga za kvasce, odnosno YPD podloga (eng. Yeast Extract-Peptone-Dextrose) sadrži 2% glukoze, 2% peptona i 1% kvaščeva ekstrakta. Potrebno je da pH podloge bude oko 5,5 jer je to optimalan pH za rast kvasaca. Korekcija pH vrši se pomoću 1M HCl.

Jedan dio gotove podloge prebacuje se u epruvete u količini od 10 mL što se koristi za prvu fazu uzgoja kvasaca. Preostala količina podloge prebacuje se u Erlenmayerove tikvice koje će služiti za drugu fazu rasta kvasaca. Podloge u epruvetama i tikvicama podvrgavaju se sterilizaciji u autoklavu pri temperaturi od 121 °C u vremenu od 15 minuta.

3.2.2. Uzgoj kvasaca

Prva faza je rast biomase kvasca na hranjivoj podlozi u epruvetama, a druga faza je rast biomase kvasaca na hranjivoj podlozi koja se nalazi u tikvicama. Kolonije kvasaca uzgojene na krutoj hranjivoj podlozi precijepu se s krute hranjive podloge pomoću sterilne, prethodno spaljene bakterijske ušice u sterilnu hranjivu podlogu u epruveti. Epruveta se lagano promiješa kako bi se biomasa s krute podloge raspršila po hranjivom mediju. Epruvete se zatim miješaju na tresilici Unimax 1000 kroz 24h, na temperaturi od 30 °C, brzinom 200 rpm. Nakon 24h vidljivo je zamućenje podloge u epruvetama zbog umnažanja stanica kvasaca.

Sadržaj epruveta prebacuje se u podlogu u tikvicama, po *Scale-up* principu. U tikvice od 500 ml s 200 ml prethodno pripremljene hranjive podloge dodana je jedna epruveta s uzgojenom biomasom kvasca.

U tikvice se dodaju ili Bis-GMA ili BPA ili ništa (kontrolni uzorak). Na 200 mL podloge dodano je 21,57 mg Bis-GMA, ili 34 µL 0,1M otopine Bisfenola A. Količina Bis – GMA koja se dodala

u podlogu, predstavlja količinu materijala koja je potrebna za učvršćivanje jedne ortodontske naprave, dok količina BPA (prethodno određena HPLC-metodom) predstavlja onu prosječnu količinu koja se u usnoj šupljini otpustila tijekom 28 dana, iz korištenog dentalnog adheziva Bis-GMA, a potrebnog za učvršćivanje jedne ortodontske naprave.

Tikvice su zatim začepljene vatom i stavljene na tresilicu Unimax 1000 sljedećih 20 h, na temperaturi 30 °C i brzinom od 200 rpm.

3.2.2.1 Određivanje broja stanica kvasaca

Neposredno nakon inokulacije i dodavanja bilo BPA ili BIS-GMA u tikvicu, provodi se prebrojavanje kvašćevih stanica pomoću Burker-Turkove komorice na svjetlosnom mikroskopu. Burker-Turkova komorica sastoji se od 16 velikih kvadrata unutar kojih se svaki sastoji od dodatnih 25 malih kvadrata. Broj stanica koji je izbrojan neposredno nakon dodatka monomera u podlogu označava nulto stanje, a nakon inkubacije od 20 h (što ujedno označava kraj eksponencijalne faze rasta kvasaca) ponovo se mjeri broj stanica kvasaca. Suspenzija kvasaca se razrjeđuje te se stavlja jedna kap na komoricu koja se prekriva pokrovnim stakalcem. Komorica se postavlja pod svjetlosni mikroskop te se namješta na povećanje od 400x, broje se stanice kvasaca u minimalno 4 kvadrata, a kasnije, kao rezultat koristi se srednja vrijednost. Iz srednje vrijednosti broja stanica računa se broj stanica u mL suspenzije. Srednja vrijednost računa se prema formuli:

$CFU/mL = (16 \times n_{sr} / V) \times rf$ gdje n_{sr} srednja vrijednost broja stanica, V volumen komorice (10^{-4} mL) i rf recipročna vrijednost faktora razrjeđenja.



Slika 6. Bürker-Türkova komorica.

Izvor: <https://www.marienfeld-superior.com/counting-chambers.html>

3.2.3. Određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

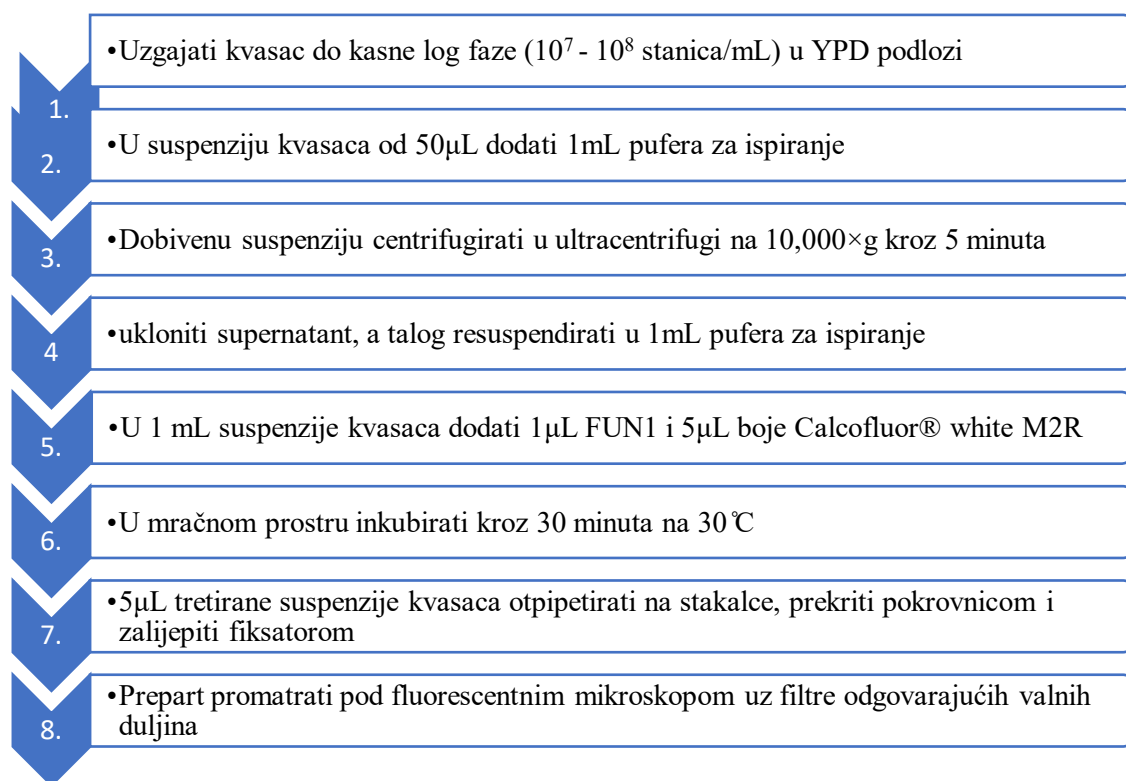
Za praćenje metaboličke aktivnosti korišten je Live/Dead Yeast Viability Kit, prema uputama proizvođača. Korištene su boje FUN 1 i Calcoflour White za određivanje metaboličke aktivnosti na fluorescentnoj mikroskopiji, dok je samo boja FUN 1 korištena za mjerenje na mikrotitarskoj pločici.

3.2.3.1. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

Za mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti stanice su pripremljene prema protokolu prikazanom slikom 7.

FUN-1 je klorirana cijaninska boja koja prodire u stanične membrane kvasaca. Stanice visoke metaboličke aktivnosti sadrže cilindrične crveno-fluorescentne strukture u vakuolama (CIVS). Mrtve stanice ili stanice s malo ili nimalo metaboličke aktivnosti pokazuju svijetlo crvenu

fluorescenciju cijele citoplazme i ne sadrže fluorescentne intravakuolarne inkluzije (CIVS). Stanice s netaknutim membranama, ali bez metaboličke aktivnosti, imaju difuznu zelenu citoplazmatsku fluorescenciju i nemaju fluorescentna intravakuolarna tijela.

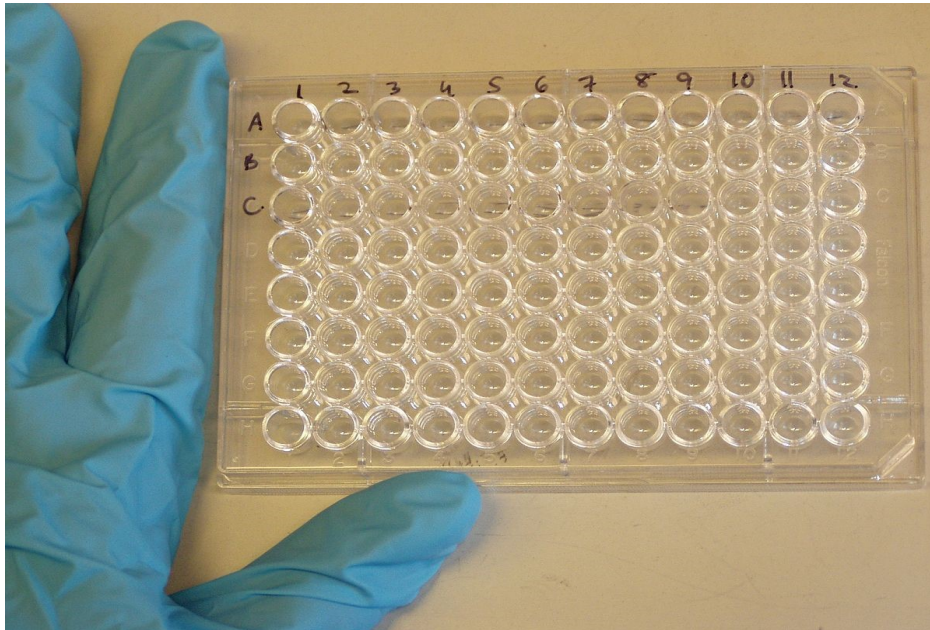


Slika 7. Shematski prikaz mikroskopskog određivanja metaboličke aktivnosti kvasca

3.2.3.2 Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

Uzorci za mikrotitarsku analizu tretiraju se bojom FUN 1, a analiza se provodi na fluorimetru. Mjeri se broj stanica kvasaca na početku (odnosno nulto vrijeme) i nakon 20 h tj. na kraju eksponencijalne faze rasta. U jažice na mikrotitarskoj ploči otpipetira se 200 μ L uzorka. Uzorci su kontrola, uzorak tretiran bisfenolom A i uzorak tretiran s Bis – GMA. Za analizu na fluorometru korištene su dvije kombinacije filtera: 485 nm ekscitacija/~ 530 nm emisija za

analizu zelenih (mrtvih) stanica i ~ 485 nm ekscitacija/~ 620 nm emisija za crvene tj. metabolički aktivne stanice. Klorirana cijaninska boja FUN-1 penetrira u membrane metabolički aktivnih stanica kvasaca koje u vakuolama stvaraju difuzno crvenu fluorescenciju tzv. CIVS, a mrtve stanice i/ili stanice s malo metaboličke aktivnosti pokazuju difuznu zelenu fluorescenciju u cijeloj citoplazmi. Mjerenjem omjera crvenih i zelenih stanica na fluorometru dobivaju se informacije o smjeru promjene u metaboličkoj aktivnosti stanica [13].



Slika 8. Mikro – titarska ploča.

Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>

Pufer za ispiranje ili GH pufer priprema se na sljedeći način:

Za 1mL G-H pufera	
	V / μ L
0,1M HEPES (pH=7)	100
20%-tna otopina D- glukoze	100
Super čista voda (dd H ₂ O)	800

4. Rezultati

4.1. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

Metabolička aktivnost kvasca, kao jedna od mjera vitalnosti kvasca određivana je bojenjem stanica fluorescentnim bojama FUN-1 (koja je dvobojna, i ima i crvenu i zelenu boju) i Calcoflour White M2R (koja stanice boji plavo). Rezimirani rezultati prikazani su tablicom 1, dok su slikom 9 prikazani mikroskopski preparati stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tretiranih s Bis-GMA, slikom 10 mikroskopski preparati stanica kvasca tretiranih BPA, a slika 11 prikazuje kontrolni (netretirani) uzorak.

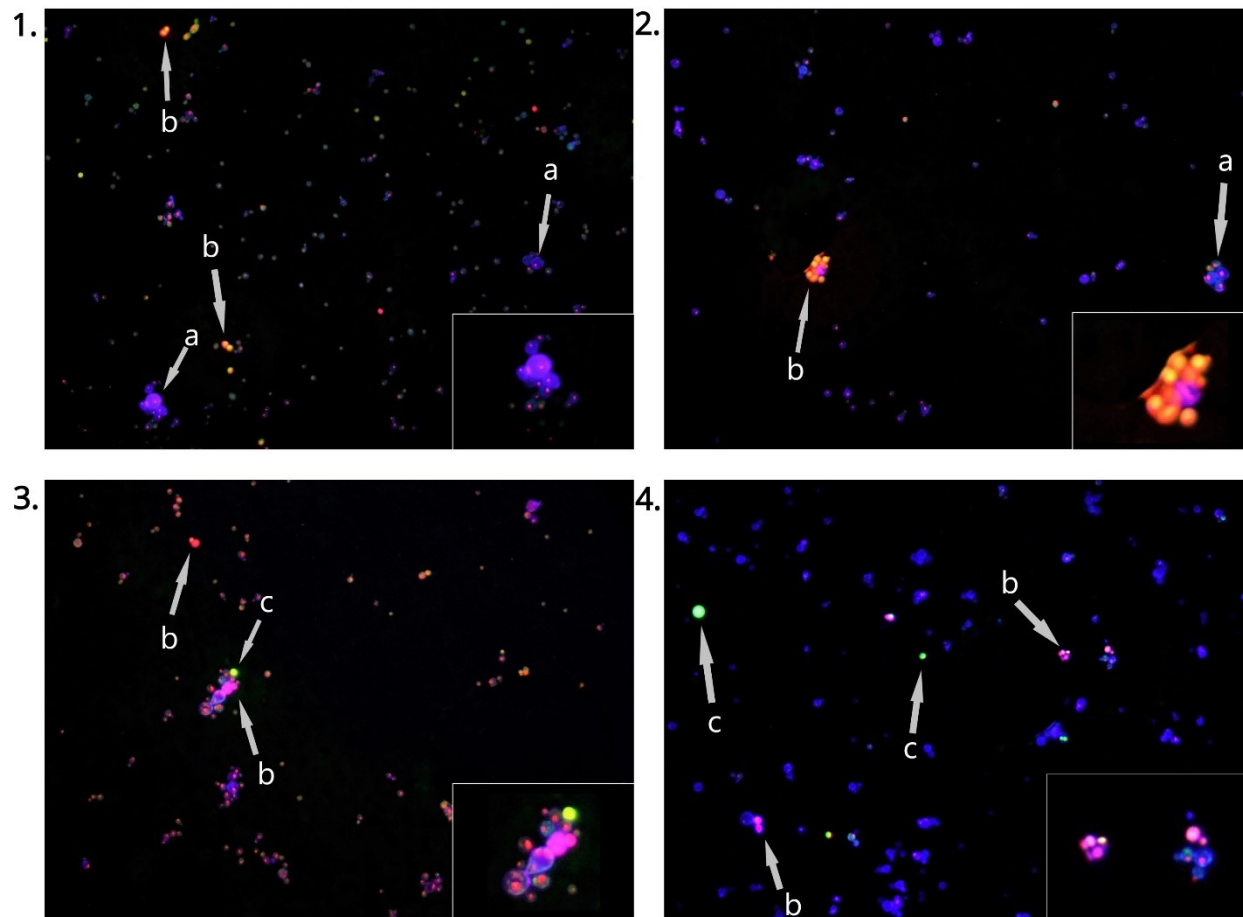
Tablica 1. Prikaz metaboličke aktivnosti stanica kvasca tretiranih Bisfenolom A i Bis – GMA i kontrolnih (netretiranih) stanica, određene brojanjem stanica pod fluorescentnim mikroskopom. Stanice su bojane kombinacijom boja FUN 1 i Calcoflour White M2R.

	% ukupnog broja stanica		
	kontrola	BPA	Bis - GMA
Plave stanice koje sadrže CIVS (a)	91.38±1.70	84.00±0.10	89.57±0.05
Stanice s malo i/ili bez metaboličke aktivnosti; ne mogu tvoriti CIVS (b)	7.73±1.78	8.00±0.05	6.88±0.03
Zelene mrtve stanice (c)	6.83±1.67	7.00±0.05	5.00±0.03
Zelene „polumjesečaste“ stanice	-	9.00±0.05	2.00±0.03

Metabolički aktivne stanice, s netaknutom membranom plazme i očuvanom metaboličkom sposobnošću, formiraju CIVS (a).

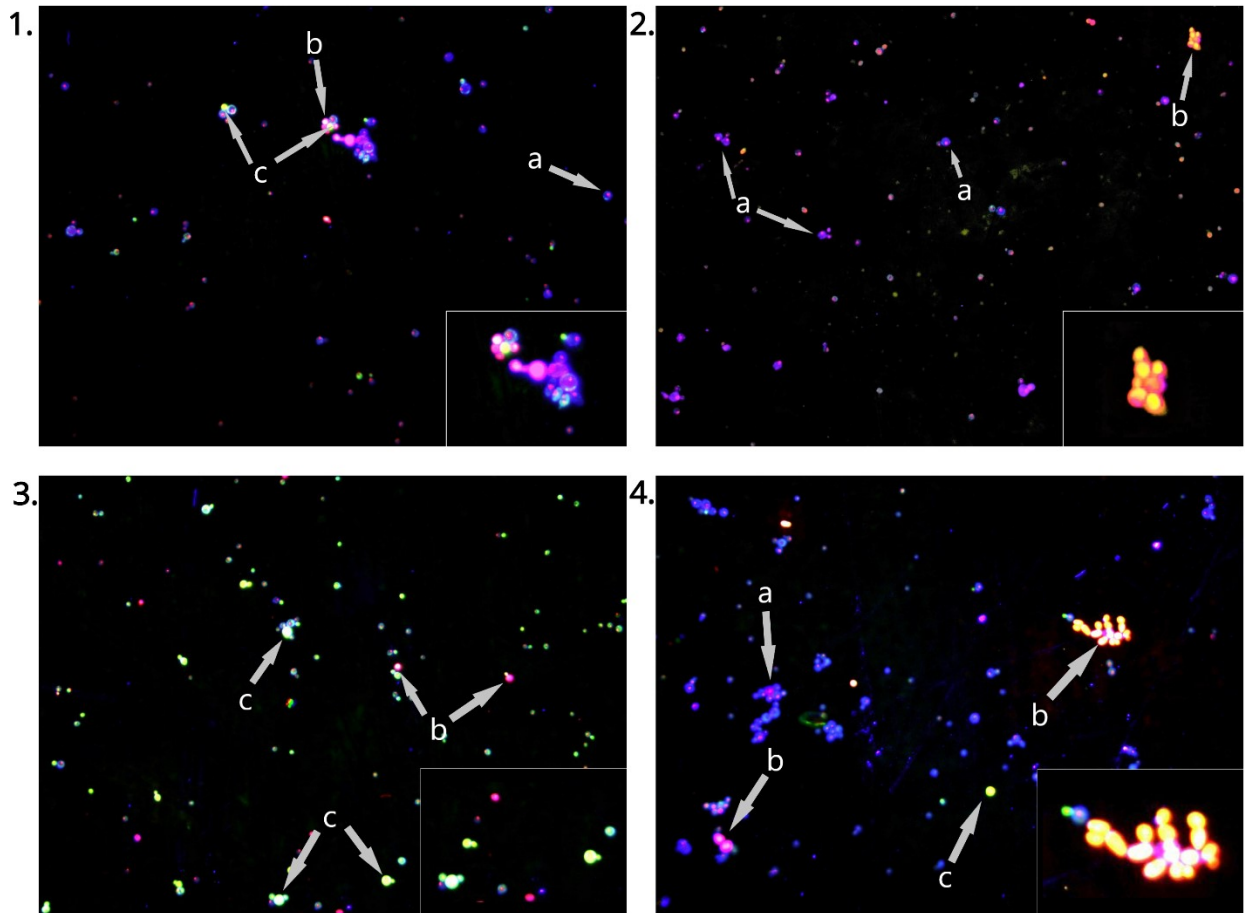
Stanice s malo metaboličke aktivnosti ili bez metaboličke aktivnosti, imaju svijetlo crvenu citoplazmatsku fluorescenciju (b).

Mrtve stanice pokazuju izuzetno svijetlo zelenu fluorescenciju (c).

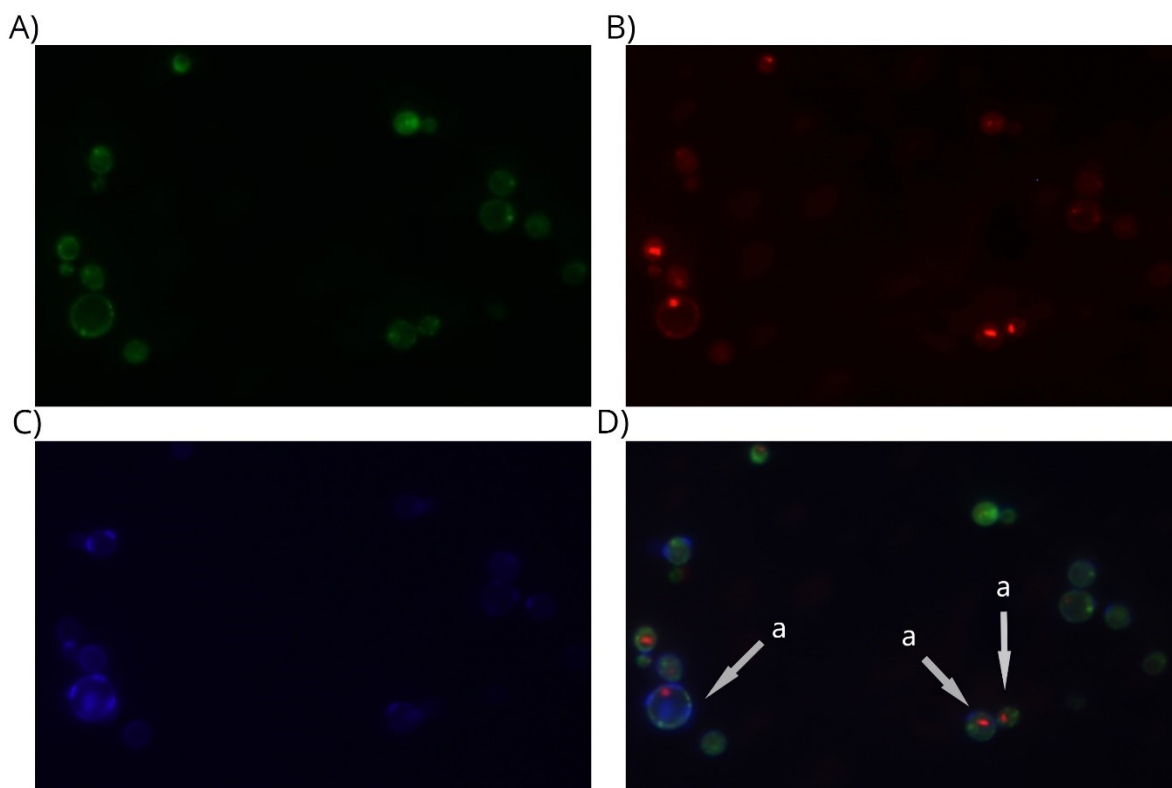


Metabolički aktivne stanice, s netaknutom membranom plazme i očuvanom metaboličkom sposobnošću, formiraju CIVS (a). Stanice s malo metaboličke aktivnosti ili bez metaboličke aktivnosti, imaju svijetlo crvenu citoplazmatsku fluorescenciju (b). Mrtve stanice pokazuju izuzetno svijetlo zelenu fluorescenciju (c).

Slika 9. Preklopljene mikroskopske slike stanica kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* tretirane s ortodontskim adhezivom Bis-GMA obojene s FUN-1 (crvena i zelena) i Calcoflour White (plava) (M=400x).



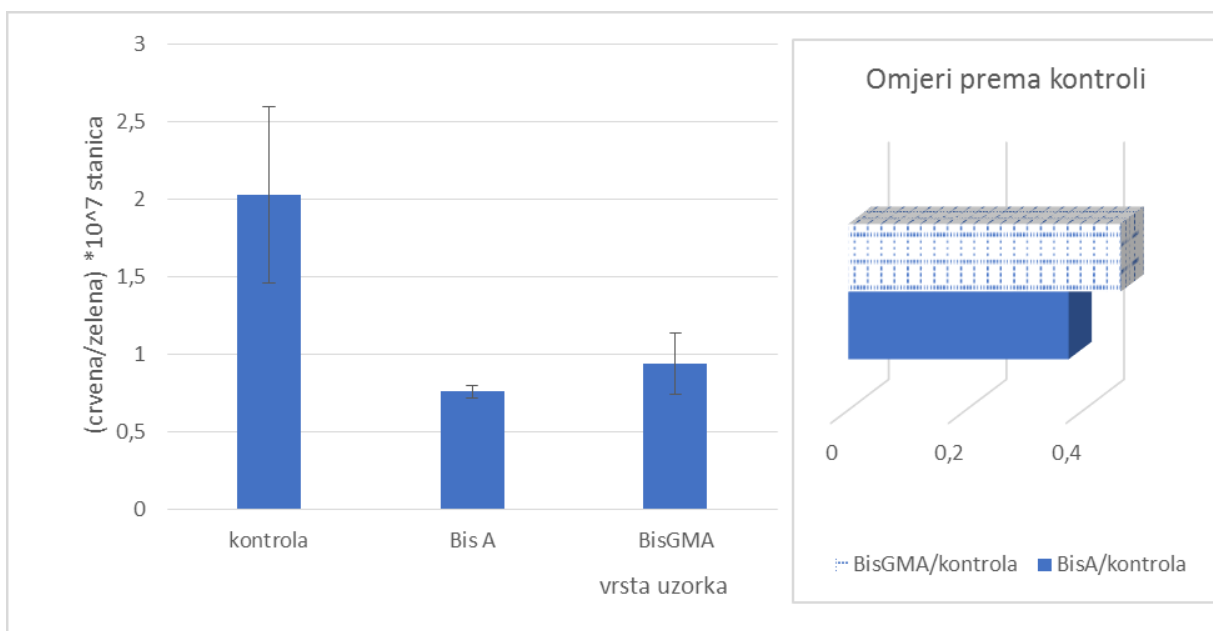
Slika 10. Preklopljene mikroskopske slike stanica kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* (M=400x) obojenih s FUN-1 (crvena i zelena) i Calcoflour White (plava) koje su tretirane s otopinom BPA. Metabolički aktivne stanice sadrže cilindrične crvene fluorescentne strukture u vakuolama (CIVS) (a, ugrađena slika 1 i 2) s blijedom i difuzno plavom/zelenom bojom. Stanice koje posjeduju malo metaboličke aktivnosti ili nemaju metaboličku aktivnost imaju svijetlo crvenu citoplazmatsku fluorescenciju (b). Mrtve stanice pokazuju izuzetno zelenu fluorescenciju i ne tvore CIVS (c, ugrađena slika 2 i 4)



Slika 11. Mikroskopska slika stanica kvasca kontrolnog uzorka, obojanog kombinacijom boja Fun1 (A i B) i Calcofluorom White M2R (C) te konačna, preklopljena slika (D); P=1000 x. Metabolički zdrave i aktivne stanice obojane su plavom bojom unutar kojih se stvara crveni CIVS(a).

4.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

Osim brojenjem obojenih stanica pod mikroskopom, metabolička se aktivnosti može odrediti flurometrom, mjernjem omjera crvene i zelene fluorescencije. Rezultati te analize prikazani su slikom 12.



Slika 12. Omjer crvene i zelene fluorescencije (x 10⁷ stanica) izmjeren fluorimetrom kod stanica koje su tretirane s Bis-GMA i BPA te u kontrolnom (netretiranom) uzorku i omjer izražen prema kontrolnim vrijednostima.

5. Rasprava

5.1. Mikroskopsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

U današnjem svijetu postoji nebrojeno mnogo toksičnih tvari koje su štetne za ljudsko zdravlje. Među njima se nalaze i materijali koji u svakodnevnoj uporabi imaju štetno djelovanje na zdravlje čovjeka. Bilo u zatvorenom prostoru u kojem provodimo većinu vremena, bilo u otvorenom prostoru ili kroz hranu koju jedemo, dolazimo u dodir s velikim brojem tih materijala koji na brojne načine utječu na naše zdravlje. Polimeri čine veliki dio tih materijala u kojima je sve više prisutan BPA.

Brojne studije istražile su toksičnost BPA, a provedene su i opsežne recenzije o jačini njegove toksičnosti.

U istraživanju Bereketoglu i sur. ispitano je djelovanje BPA na genom eukariotskih stanica. *Saccharomyces cerevisiae* korišten je kao modelni organizam za analizu transkripcijskih profila gena. Bereketoglu i sur. kao odgovor *S. cerevisiae* na BPA, izlagali su stanice kvasaca niskim i visokim količinama BPA. Za nisku koncentraciju koristila se količina od 50 mg/L BPA što je rezultiralo <10% inhibicije staničnog broja. S druge strane visoka koncentracija je sadržavala 300 mg/L BPA što je rezultiralo u inhibiciji rasta stanične kulture >70%. Izloženost 300 mg/L BPA rezultirala je ozbiljnim promjenama nivoa ekspresije nekoliko gena koji su uključeni u oksidativnu fosforilaciju, ciklus trikarboksilne kiseline, ribosomalnu aktivnost, replikaciju i kemijske reakcije. Suprotno tome, primijećene su samo male promjene u ekspresiji gena koji su uključeni u ove procese u stanicama izloženim 50 mg/L BPA. Bereketoglu i sur. navode da ovi rezultati pokazuju da stanice kvasca reagiraju na BPA na molekularnoj razini ovisno o koncentraciji pomoću različitih gena i pružaju uvid u molekularne mehanizme koji su potaknuti djelovanjem BPA [14].

Cilj ovog istraživanja bio utvrditi kako dentalni adheziv Bis – GMA i njegov raspadni produkt BPA djeluju na metaboličku aktivnost stanice kvasaca. Kao model ovog završnog rada korišten je organizam *Saccharomyces cerevisiae* W303 ili pivski kvasac jer je sličniji životinjama nego biljkama što ga čini prikladnijim organizmom za proučavanja osnovnih procesa u eukariotskim organizmima. Prednost je jednostavan uzgoj te kratko generacijsko vrijeme [15].

U prvom dijelu ispitivano je djelovanje otopine Bisfenola A i Bis-GMA na metaboličku aktivnost stanice kvasaca. Stanice kvasaca tretirane su ili s Bisfenolom A (ciljana koncentracija je 2,03 mg/L ; slika?) ili pak s Bis-GMA (ciljana koncentracija je 0,78 mg/L; slika ?) te inkubirane na 20h. Pod fluorescentnim mikroskopom brojio se udio pojedinih vrsta stanica. Prema Kwolek- Mirek i sur. stanice kvasca koje sadrže cilindrične intravakuolarne strukture (CIVS) su metabolički aktivne, stanice koje pokazuju izrazito svijetlu, difuznu zelenu fluorescenciju su metabolički mrtve, dok stanice bilo s malo metaboličke aktivnosti ili koje je uopće nemaju, imaju izrazito crvenu citoplazmatsku fluorescenciju [13]. U ovom su istraživanje zabilježene značajne količine stanica sa smanjenom metaboličkom aktivnošću (slika 9 i 10, b). Također, zabilježen je i manji broj metabolički neaktivnih, mrtvih stanica koje karakterizira jarka zelena fluorescencija (slika 9 i 10, c). Pod djelovanjem Bisfenola A 84% stanica ostalo je metabolički aktivno, 8% stanica pokazuje smanjenu metaboličku aktivnost, a 7% stanica je metabolički mrtvo (Tablica 1). Dok s druge strane gotovo 90% stanica tretiranih s Bis-GMA su metabolički aktivne, 7% stanica ima smanjenu metaboličku aktivnost i 5% stanica je metabolički mrtvo. Dakle, zabilježen je manji postotak stanica sa smanjenom metaboličkom aktivnosti i mrtvih stanica kod tretmana s Bis – GMA u odnosu na tretman Bisfenolom A. Razlog tome bi se mogao pripisati vjerojatnom smanjenom otpuštanju BPA iz uzorka Bis-GMA. Kod stanica tretiranih s Bis-GMA raspadni produkt BPA polako se otpušta u suspenziju stanice

kvasaca tijekom 20h, dok su stanice u tretmanu s BPA dobile tu istu koncentraciju izravno u suspenziju. Bereketoglu i sur. u svom istraživanju i navode da djelovanje BPA na stanice kvasaca uvelike ovisi o njegovoj koncentraciji. Velika koncentracija, od 300 mg/L BPA, imala je učinak na različite procese i nekoliko gena, uz znatne ireverzibilne promjene u ekspresiji što je rezultiralo značajnom inhibicijom rasta stanica kvasaca. Izloženost BPA od 50 mg/L izazvala je skromne promjene u ekspresiji kod malog broja gena [14]. U odnosu na Bereketoglu i sur. koncentracije korištene u ovom radu su niske, ali predstavljaju vrijednosti koje su određene eksperimentalno da se otpuštaju u ustima iz jedne ortodontske naprave tijekom 28 dana. I kod tih niskih vrijednosti primijećen je učinak na metaboličku aktivnost.

Štoviše, u stanicama tretiranim s BPA, u preparatima u zelenoj fluorescenciji pronađene su stanice specifičnog „polumjesečastog“ oblika, i to u količini od 2-16% od ukupnog broja stanica. Iako je difuzno zelena boja prstenastog oblika normalna faza u procesiranju boje u stanici i njenog nestajanja pod zelenim svjetlom, a pojavljivanja u obliku crvenih unutarstaničnih struktura, taj je polumjesečasti oblik (osobito kod tretmana s BPA) izraženiji i postojaniji. Essary i Marshall u svome istraživanju objašnjavaju metabolizam boje FUN-1, njen transport do vakuola u metabolički aktivnim stanicama te nakupljanje u fluorescentno crvene cilindrične intravakuolarne strukture (CIVS) unutarstaničnim transportom. Samo procesiranje je kratkotrajno i trebalo bi trajati oko 30 min [16]. U ovom je istraživanju polumjesečastih stanica, izrazito debelih i izraženih rubova bilo i nakon nekoliko sati. Za sada o tome u literaturi nismo mogli pronaći nikakvo objašnjenje.

5.2. Fluorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti kvasca

Osim mikroskopski, metabolička aktivnost je praćena i fluorimetrijski. Fluorometrom se pratio omjer crvena/zelena fluorescencija, kod stanica kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* tretiranih dentalnim adhezivom Bis-GMA, njegovim razgradnim produktom Bisfenolom A te kod netretiranih stanica. Veliki omjer crvena/zelena fluorescencija ukazuje na efikasnu pretvorbu iz jednolike zelene boje u crvene CIVS strukture. Optimalna vrijednost za taj omjer iznosi od 1,5-2,0 nakon 60 minuta [17]. S obzirom da vrijednost tog omjera kod netretiranih stanica iznosi oko 2, kontrolni se uzorak može smatrati referentnim i izračunat je i uspoređen omjer (Slika 12) BSA/kontrola i Bis-GMA/kontrola. Kod oba tretmana omjer crvena/zelena fluorescencija značajno je smanjen u odnosu na kontrolu, kod Bis-GMA više od 2 puta, a kod BPA 2,7 puta i ukazuje na znaćajan utjecaj oba dentalna materijala na metabolićku aktivnost kvasca. Niža vrijednost omjera crvena/zelena kod tretmana s BPA ($7,6 \times 10^6$ stanica) u odnosu na tretman s Bis-GMA ($9,4 \times 10^6$ stanica) ukazuje na snaćniji učinak BPA na stanice kvasca i u skladu je s rezultatima dobivenima mikroskopskim određivanjem metabolićke aktivnosti.

6. Zaključci

Na kraju ovoga rada može se zaključiti da:

- Primjena dentalnog adheziva Bis – GMA i njegovog raspadnog produkta BPA uzrokuje značajno smanjenje metaboličke aktivnosti i/ili smrt stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.
- BPA uzrokuje nešto izraženije smanjenje metaboličke aktivnosti i smrt kvasaca. Razlog tomu mogao bi se prepisati smanjenom otpuštanju BPA iz uzorka Bis – GMA obzirom na drugi tretman gdje su stanice tretirane s značajno većom početnom koncentracijom BPA.
- Kod oba tretmana zabilježena je pojava specifičnih stanica sa zelenim „polumjesečastim“ oblikom koji se javljaju u rasponu od 2 – 16% u odnosu na ukupan broj stanica. Za sada u literaturi nisu pronađena nikakva objašnjenja, ali vjeruje se da će buduća istraživanja cjelokupnog unutarstaničnog transporta kvasaca pružiti odgovore na ovo pitanje.
- Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u oba tretmana nakon 20h inkubacije pokazuju smanjenje vijabilnosti u odnosu na kontrolne vrijednosti. Ortodontski adheziv Bis – GMA uzrokovao je smanjenje vijabilnosti stanica za više od 2 puta, suprotno tome kod stanica tretiranih s BPA zabilježeno snažnije smanjene vijabilnosti od 3 puta u odnosu na kontrolne vrijednosti.

7. Literatura

1. Kučić Grgić, D., Kovačević, A., Lovrinčić, E., Ocelić Bulatović, V. i Vuković Domanovac, M. (2019). Biorazgradnja bisfenola A u okolišu. *Hrvatske vode*, 27 (107), 1-6. dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/>
2. Rykowska, I., & Wasiak, W. (2006). Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. Dostupno na: <https://www.semanticscholar.org/>
3. Söderholm, K.-J., & Mariotti, A. (1999). Bis-gma-based resins in dentistry: are they safe? *the journal of the american dental association*, 130(2), 201–209. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/>
4. Luo, S., Zhu, W., Liu, F., & He, J. (2016). Preparation of a Bis-GMA-Free Dental Resin System with Synthesized Fluorinated Dimethacrylate Monomers. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2014. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187814/>
5. Michałowicz, J. (2014). Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 738–758. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668914000313>
6. Allard, P. (2014). Bisphenol A. *Biomarkers in Toxicology*, 459–474. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124046306000270>
7. Löfroth, M., Ghasemimehr, M., Falk, A., & Vult von Steyern, P. (2019). Bisphenol A in dental materials – existence, leakage and biological effects. *Heliyon*, 5(5), e01711. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844018330184>

8. Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., Mietzner, T. Jawetz, Melnick, Adelberg
Medicinska mikrobiologija: Mikologija. dvadeset šesto američko izdanje/prvo hrvatsko
izdanje, Split: Placebo d.o.o., 2015 (prijevod udžbenika).
9. Van der Klei, I. J., & Veenhuis, M. (2006). Yeast and filamentous fungi as model
organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell
Research*, 1763(12), 1364–1373. Dostupno na:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050005>
10. Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES | Introduction. *Encyclopedia of Food
Microbiology*, 297–301. Dostupno na:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002901>
11. Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. *Encyclopedia
of Food Microbiology*, 309–315. Dostupno na:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002925>
12. Feldmann, H. (2012). Yeast Cell Architecture and Functions. *Yeast: Molecular and cell
biology*. 5-24.
13. Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for
assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*. Dostupno na:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25154541>
14. Bereketoglu, C., Arga, K. Y., Eraslan, S., & Mertoglu, B. (2016). Analysis of
transcriptional profiles of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to bisphenol A. *Current
Genetics*, 63(2), 253–274. Dostupno na:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27460658>

15. Van der Klei, I. J., & Veenhuis, M. (2006). Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1364–1373. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050005>
16. Essary, B. D., & Marshall, P. A. (2009). 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. *Journal of Microbiological Methods*, 78(2), 208–212. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501122>
17. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07009.pdf>

8. Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Dinko Radojković

Datum rođenja: 4. veljače 1998.

Mjesto rođenja: Đakovo

Državljanstvo: hrvatsko

Narodnost: Hrvat

Adresa: Stjepana Radića Tomašanci, 31422 Gorjani

Telefon: +385955836996

E-mail: dinko.radojkovic04@gmail.com

Obrazovanje:

2004.-2018. Područna škola Tomašanci, Kralja Tomislava 2 Tomašanci, 31422 Gorjani

2004.-2012. Osnovna škola Gorjani, Bolokan 20, 31422 Gorjani

2012.-2016. I. Gimnazija Osijek, Županijska 4, 54000 Osijek

2016.-2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Prediplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka

Radno iskustvo:

srpanj 2016.- rujan 2016. - Servir, grill „Lanterna“, Jadranka d.o.o, Mali lošinj

srpanj 2017.- rujan 2017. – Konobar, bistro „Čić Matin kutak“, Đakovo

srpanj 2019. – rujan 2019. – Blagajnik, Tommy d.o.o, Nin

Fizički poslovi raznih profila

Vještine:

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezik: engleski, njemački

