

Ekspresija enzima mirozinaze u korijenu, stabljici i listu biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.)

Kurić, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:816626>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

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

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Laura Kurić

**EKSPRESIJA ENZIMA MIROZINAZE U
KORIJENU, STABLJICI I LISTU BILJKE
DRAGOLJUB (*Tropaeolum majus* L.)**

Diplomski rad

Split, 2023.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc. dr. sc. Nives Kević i neposredne voditeljice dr. sc. Ivane Vrca, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije (*mag. educ. biol. et chem.*).

ZAHVALA

Ovim putem želim se zahvaliti svojoj mentorici doc.dr.sc. Nives Kević što me zainteresirala za temu i pružila mi povjerenje i uvjete za provođenje istraživanja kao i pomoć pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala što ste mi omogućili da naučim koristiti velik broj laboratorijske aparature i podupirali me u samostalnom provođenju postupaka kako bih usavršila baratanje histološkim tehnikama. Ne smijem zaboraviti zahvaliti na trudu uloženom da odgovorite na svako moje pitanje i objasnite mi sve što me zanimalo, a znamo i jedna i druga da me je baš dosta toga zanimalo. Možda i najvažnije, hvala na prijateljskom odnosu, svakom ulovljenom predahu provedenom sa smiješkom i zajedničkom gastronomskom istraživanju Splitsa 3. Od moje druge godine faksa kada sam Vas upoznala na histologiji vjerovali ste u mene i podupirali me u razvoju kroz praktikume, demonstrature, završni rad, a kao krana svega ovaj diplomski rad za koji smo znale da će biti veliki izazov, ali smo zajedničkim snagama došle do kraja. Velik ste dio mojih sretnih fakultetskih dana i zato još jednom veliko hvala!

Također želim zahvaliti dr. sc. Ivani Vrci što je sa mnom podijelila svoju strast oko istraživanja ove dragocjene biljke, provela sa mnom sate uzorkujući najsitnije komadiće tkiva i bila dostupna u bilo koje doba dana odgovoriti na moja pitanja.

Zahvaljujem se svojim kolegama, prijateljima i cimeru Riu, koji su ovaj studij učinili lakšim, zabavnijim, uspješnijim i boljim.

Zahvaljujem se Jakovu jer si shvatio da mi je bitno i nikada nisi tražio da nešto mijenjam, nego si podržao i bio tu za mene kada je to najviše trebalo. Hvala ti što si kao puzzlica došao u moj život, postavio sa mnom velike ciljeve i nisi odustao od ostvarenja istih. Budućnost s tobom najveća je motivacija.

Hvala mojoj prekrasnoj obitelji, malom krugu velikih ljudi. Uz vašu podršku uspjeh je došao lako, a neuspjeh nije bio opcija.

Zahvaljujem se bratu Đaniju jer si me svojim primjerom naučio da u životu želim ustrajati i postizati velike stvari. Hvala što nesebično dijeliš svoje znanje i iskustvo, te podržavaš moje snove i pomažeš mi da ih ostvarim.

Najveća zahvala ide mojim prekrasnim roditeljima, Maji i Elvisu koji su mi omogućili studiranje i podržali me u svakoj mojoj odluci kroz sve godine školovanja. Hvala vam što ste mi svojim primjerom pokazali što znači postići uspjeh i koliko odricanja stoji iz njega. Hvala Vam što ste mi pokazali put kojim trebam koračati i pazili da nikada ne skrenem s njega i onda kada je bilo najteže skupiti snagu i krenuti dalje. Zauvijek ste moj najveći oslonac i sretna sam što s vama dijelim diplomu koja je vaša koliko i moja.

Studentica Laura Kurić

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Diplomski rad

EKSPRESIJA ENZIMA MIROZINAZE U KORIJENU, STABLJICI I LISTU BILJKE DRAGOLJUB (*Tropaeolum majus* L.)

Laura Kurić

SAŽETAK

Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je samonikla, jednogodišnja, zeljasta biljka iz porodice dragoljupki (Tropaeolaceae). Glukozinolati su jedinstvena i važna skupina specijaliziranih metabolita u nekim vrstama biljaka. Glukozinolati su kemijski stabilni sve dok ne dođu u kontakt s enzimom mirozinazom (β -tioglukozid glukohidrolaza). Hidroliziraju se u niz biološki aktivnih spojeva. Enzim mirozinaza katalizira hidrolizu tioglukozidne veze, tj. omogućava cijepanje veze između sumpora i glukoze u glukozinolatima, što dovodi do oslobađanja glukoze, sulfata i aglikona. Mirozinaza je u biljci prisutna u idioblastima abnormalnog oblika, veličine i sadržaja koji se zovu mirozinske stanice. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti pozitivan izražaj enzima mirozinaze tipa 1 u području korijena, stabljike i lista biljke dragoljub kroz različite razvojne faze nakon nicanja biljke. U ovom su radu korištene osnovne histološke tehnike uklopa tkiva biljnog podrijetla, kao i imunohistokemijsko i imunofluorescentno bojanje na tkivu dragoljuba. Pozitivan imunofluorescencijski signal enzima mirozinaze uočen je u svim istraživanim dijelovima biljke, kroz sve četiri razvojne faze u mirozinskim stanicama ili kao raspršene stanice u osnovnom i provodnom tkivu. Najizraženiji pozitivni imunofluorescencijski signal uočen je u idioblastima osnovnog tkiva korijena.

Ključne riječi: glukozinolati, mirozinaza, mirozinska stanica, imunofluorescencija, imunohistokemija
Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Rad sadrži: 69 stranica, 43 slike, 16 tablica, 58 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: doc.dr.sc. Nives Kević

Neposredni voditelj: dr. sc. Ivana Vrca

Ocjenjivači:

dr. sc. Nives Kević, doc. docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

dr. sc. Ivana Vrca doktorica znanosti Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

dr. sc. Elma Vuko izv. prof. izvanredna profesorica, PMF, Sveučilište u Splitu

Rad prihvaćen: Rujan, 2023.

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Graduation thesis

EXPRESSION OF THE ENZYME MYROSINASE IN ROOT, STEM AND LEAF OF THE NASTURTIUM PLANT (*Tropaeolum majus* L.)

Laura Kurić

SUMMARY

Tropaeolum majus L. is a wild, annual, herbaceous plant from the *Tropaeolaceae* family. Glucosinolates are a unique and important group of secondary metabolites in some plant species. Glucosinolates are chemically stable until they come into contact with the enzyme myrosinase (β -thioglucoside glucohydrolase). They are hydrolyzed into a number of biologically active compounds. The enzyme myrosinase catalyzes the hydrolysis of the thioglucosidic bond, i.e. it enables the cleavage of the bond between sulfur and glucose in glucosinolates, which leads to the release of glucose, sulfates and aglycones. In the plant, myrosinase is present in idioblasts of abnormal shape, size and content, which are called myrosin cells. The aim of this research was to investigate the positive expression of the enzyme myrosinase type 1 in the area of the root, stem and leaf of the nasturtium through different developmental stages after the plant has emerged. In this work, basic histological techniques of plant-derived tissue were used, as well as immunohistochemical and immunofluorescent staining of the nasturtium tissue. A positive immunofluorescence signal of the enzyme myrosinase was observed in all investigated parts of the plant, through all four developmental phases in myrosin cells or as scattered cells in the ground and vascular tissue. The strongest positive immunofluorescence signal was observed in the idioblasts of the ground tissue of the root.

Keywords: glucosinolates, myrosinase, myrosine cell, immunofluorescence, immunohistochemistry
Thesis deposited in library of Faculty of Science, University of Split.

Thesis consists of 69 pages, 43 pictures, 16 tables, 58 references. Original language: Croatian

Supervisor: Nives Kević, Ph.D.

Immediate supervisor: Ivana Vrca, Ph.D.

Reviewers: Ph.D. Nives Kević, *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*

Ph.D. Ivana Vrca, *Doctor of Faculty of Science, University of Split*

Ph.D. Elma Vuko, *Associate Professor of Faculty of Science, University of Split*

Thesis accepted: September, 2023.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam diplomski rad s naslovom EKSPRESIJA ENZIMA MIROZINAZE U KORIJENU, STABLJICI I LISTU BILJKE DRAGOLJUB (TROPAEOLUM MAJUS L.) izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Nives Kević. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u diplomskom radu na uobičajen, standardan način, citirala sam i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

*Studentica
Kurić Laura*

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. OPĆE KARAKTERISTIKE BILJKE DRAGOLJUB (<i>Tropaeolum majus</i> L.) | 1 |
| 1.1.1. Morfologija dragoljuba | 2 |
| 1.1.2. Biološka svojstva dragoljuba | 4 |
| 1.1.3. Kemijski sastav dragoljuba | 4 |
| 1.1.4. Ljekovita svojstva i primjena dragoljuba..... | 6 |
| 1.2. GLUKOZINOLATI..... | 8 |
| 1.2.1. Glukozinolati..... | 8 |
| 1.2.2. Hidroliza glukozinolata | 9 |
| 1.2.3. Glukozinolati u biljci <i>Tropaeolum majus</i> L. | 10 |
| 1.3. MIROZINAZA..... | 11 |
| 1.3.1. Mirozinaza..... | 11 |
| 1.3.2. Struktura mirozinaze | 11 |
| 1.3.3. Uloga mirozinaze kod biljaka | 13 |
| 1.3.4. Kronologija istraživanja vezanih za mirozinazu | 14 |
| 1.3.5. Mirozinske stanice..... | 15 |
| 1.3.6. "Mustard oil bomb" hipoteza..... | 17 |
| 1.3.7. Uloga i lokalizacija askorbinske kiseline | 22 |
| 1.3.8. Lokalizacija mirozinaze u biljnim organima..... | 22 |
| 1.3.9. Mehanizam djelovanja mirozinaze..... | 30 |
| 1.3.10. Mirozinazna aktivnost u sjemenu, sadnicama i kod odraslih biljaka uljane repice | 31 |
| 1.4. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJENJE..... | 33 |
| 1.5. NEIZRAVNA IMUNOFLORESCENCIJA | 34 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 35 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 35 |
| 3.1. IZRADA HISTOLOŠKIH PREPARATA | 36 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1.1. | Fiksacija | 36 |
| 3.1.2. | Dehidracija | 36 |
| 3.1.3. | Natapanje..... | 37 |
| 3.1.4. | Prožimanje tkiva i izrada parafinskih blokova | 37 |
| 3.1.5. | Rezanje parafinskih blokova | 39 |
| 3.1.6. | Deparafiniranje tkiva..... | 39 |
| 3.1.7. | Bojanje tkiva | 40 |
| 3.1.8. | Utrajnjivanje tkiva..... | 42 |
| 3.1.9. | Mikroskopiranje | 43 |
| 3.2. | IMUNOFLUORESCENCIJA (IF) | 43 |
| 4. | REZULTATI..... | 45 |
| 4.1. | MJERENJE TKIVA PRIJE UKLAPANJA | 45 |
| 4.2. | EKSPRESIJA ENZIMA DOBIVENA IMUNOFLORESCENCIJOM | 51 |
| 4.2.1. | Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u korijenu biljke dragoljub (Tropaeolum majus L.) kroz četiri različite faze rasta biljke..... | 51 |
| 4.2.2. | Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u stabljici biljke dragoljub (Tropaeolum majus) kroz četiri različite faze rasta biljke | 52 |
| 4.2.3. | Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u listu biljke dragoljub (Tropaeolum majus) kroz četiri različite faze rasta biljke | 53 |
| 4.3. | STATISTIČKA OBRADA REZULTATA DOBIVENA ANOVA ANALIZOM I PROVEDBOM TURKYJEVOG TESTA VIŠESTRUKÉ USPÓREDBE | 53 |
| 4.4. | IMUNOHISTOKEMIJSKA POTVRDA DOBIVENIH REZULTATA | 55 |
| 5. | RASPRAVA | 58 |
| 6. | ZAKLJUČAK | 63 |
| | LITERATURA..... | 65 |

SLIKE

| | |
|---|----|
| Slika 1. Biljka dragoljub u prirodnom staništu; (Objektiv, 2020) | 1 |
| Slika 2. Morfologija biljke dragoljub (Osnat, 2023)..... | 2 |
| Slika 3. Dijelovi biljke dragoljub (Al-Robai i sur., 2022) | 3 |
| Slika 4. Identifikacija sastava jestivih cvjetova i udjela pojedinih fenolnih spojeva kao ukupnih spojeva identificiranih pomoću HPLC-DAD_ESI/MSn (Navarro.González i sur., 2014) | 5 |
| Slika 5. Salata od dragoljuba (Lalicki, 2012) | 7 |
| Slika 6. Podjela glukozinolata ovisno o strukturi bočnog lanca (Zekić, 2013) | 8 |
| Slika 7. Nazivi i strukture produkata koji nastaju razgradnjom glukozinolata. Mirozinaza katalizira stvaranje aglikona dok se konačni produkti formiraju neenzimski ili putem epitiospecifičnog proteina (Chen i Andreasson, 2001) | 9 |
| Slika 8. Struktura benzil glukozinolata/glukotropeolina (Vrca i sur., 2021)..... | 10 |
| Slika 9. Trodimenzionalna struktura monomera mirozinaze (Rask i sur., 2000.)..... | 12 |
| Slika 10. Glikolizirani dimer mirozinaze..... | 13 |
| Slika 11. Opća shema hidrolize glukozinolata katalizirane mirozinazom (Pessina i sur., 1990) | 14 |
| Slika 12. Model "Bomba s uljem gorušice" za odijeljivanje mirozinaze, glukozinolata i askorbinske kiseline predložen od strane Lüthy i Matile (1984). Model pretpostavlja lokalizaciju mirozinaze koja je prikazana u proteinskim tijelima/vakuolama idioblasta koji idioblasta koji se zovu mirozinaza stanice (Rask i sur., 2000). | 17 |
| Slika 13. Imunohistokemijska analiza ekspresije mirozinaze u listu B. napus koristeći monoklonalno 3D7 anti-mirozinaza antitijelo; 13 A - mezofil; 13 B - floem; stanice koje sadrže mirozinazu označene su strelicom (mjerna skala=10µm) (Höglund i sur., 1991) | 24 |
| Slika 14. Lokalizacija mirozinaze u listu uz pomoć monoklalnog 3D7 antitijela; na slici je prikazan signal u zaštitnim stanicama i stanicama parenhima vaskularnog tkiva (Höglund i sur., 1991)..... | 25 |
| Slika 15. Lokalizacija mirozinaze u stabljici uz pomoć monoklalnog 3D7 antitijela; prikaz signala u područjima ksilema i korteksa stabljike (Höglund i sur., 1991) | 25 |
| Slika 16. Lokalizacija mirozinaze u korijenu uz pomoć monoklalnog 3D7 antitijela; prikaz signala u području korteksa korijena (Höglund i sur., 1991)..... | 25 |
| Slika 17. Distribucija i morfologija mirozinskih stanica u primarnom korijenu nakon 4 sata imbibicije i korijenu sadnice Brassica napus. Imunofluorescencijsko označavanje mirozinske stanica na periferiji primarnog korijana (A); Fazno kontrastna mikroskopija iste regije (B); | |

| | |
|---|----|
| imunoperoksidazno označavanje iste regije u području korijena (C i D) (A i B x100; Cx240; Dx2000) (Bones i sur., 1991) | 26 |
| Slika 18. Morfološke promjene zrna mirozineze u korijenu 4 sata nakon imbibicije (A) i 2 dana nakon sijanja (B) i 14 dana nakon sijanja (C). Sve slike predstavljaju imunofluorescentno označavanje mirozinaze (A x770; B x390; C x300) (Bones i sur., 1991)..... | 27 |
| Slika 19. Imunohistokemijska analiza mirozinaze u vrste <i>Arabidopsis thaliana</i> L. korištenjem 3D7 antitijela. U potpuno zrelih listovima biljke stare 25 dana, mirozina je pronađena u parovima idioblastičnih stanica u floemu parenhima (A i B). U cvjetnim pupoljcima neke stanice sadrže mirozinazu (C i F) kao i latice i lapovi (C). U 10 dana starim plodovima idioblasti koji isadrže mirozinazu u parenhimu floemskih stanica veći su od okolnih stanica i njihov sadržaj je više granuliran (D i G). Strelice pokazuju stanice s dugom ekspresijom mirozinaze. Žućkasto obojenje izvan endosperma zadržava neoksidirani supstrat i stoga se smatra pozadinom (E). U klici staroj 5 dana otkrivene su stanice koje sadrže mirozin među stanicama floema u području cvjetne osi. Ksilen je označen s +, a ljestvica veličine odgovara 10 µm (Andréasson i sur., 2001) | 28 |
| Slika 20. Svjetlosna mikroskopija stanica mezofila u kotiledonima (A i B) i u stanicama korijenovog vrška (C) izolirane iz 24 sata starih sadnica biljaka A – rotkvice (<i>Raphanus sativus</i> L.), B - bijele gorušice (<i>Sinapis alba</i> L.) i C - ognjica (<i>Iberis amara</i> L.) uzgojene na svjetlu; MC – stanice mirozina; AC – stanice slične aleuronu; A: x 510, B: x 760. (Bones i Iversen, 1985)..... | 29 |
| Slika 21. Svjetlosna mikroskopija uzdužnih presjeka tkiva kore u hipokotiledonima A – bijele gorušice (<i>Sinapis alba</i> L.) nakon 2 sata imbibicije na svjetlu i stanice korteksa vrha korijena B – rotkvice (<i>Raphanus sativus</i> L.) nakon 24 sata na svjetlu; MC – mirozinske stanice; A: x 400, B: x 410. (Bones i Iversen, 1985)..... | 29 |
| Slika 22. Mirozinazna aktivnost u organima sadnice vrste <i>B. napus</i> L. za vrijeme od 20 dana nakon sijanja (Bones, 1990) | 32 |
| Slika 23. Shematski prikaz postupka i slika mikroskopskog preparata nastalog klasičnim imunohistokemijskim bojanjem (Vukoja i sur., 2017)..... | 33 |
| Slika 24. Shematski prikaz imunohistokemijskog označavanja antigena (Celnovte, 2023) | 33 |
| Slika 25. Indirektna metoda bojanja imunofluorescencijom (Medri, 2023)..... | 34 |
| Slika 26. Sjeme biljke dragoljub (<i>Tropaeolum majus</i> L.) korišteno za uzgoj u kontroliranim uvjetima (Vlastita fotografija, 2023) | 35 |
| Slika 27. Obezbojena tkiva nakon ispiranja u ksilenu (Histološki laboratorij, vlastita fotografija, 2022)..... | 37 |

| | |
|--|----|
| Slika 28. HistoCore Arcadia H (Katalog znanstveno – istraživačke opreme PMF-ST)..... | 38 |
| Slika 29. Uzorci biljnog tkiva uklopljeni u parafin na plastičnim diskovima (Histološki laboratorij, vlastit izvor, 2022) | 38 |
| Slika 30. Rotacijski mikrotom HistoCore BIO CUT (Katalog znanstveno – istraživačke opreme PMF-ST)..... | 39 |
| Slika 31. Peglanje parafinskih rezova u vodenoj kupelji (Rolls, G. (2008): 101 Steps to Better Histology. Leica microsystems)..... | 39 |
| Slika 32. Klica dragoljuba | 46 |
| Slika 33. <i>Tropaeolum majus</i> L.; A: biljka stara 19 dana; B: uzorak koji je mjereno u prvoj fazi istraživanja | 47 |
| Slika 34. <i>Tropaeolum majus</i> L.; A i B: biljka stara 26 dana; C: uzorak koji je mjereno u drugoj fazi..... | 48 |
| Slika 35. <i>Tropaeolum majus</i> L.; A: uzorci koje smo mjerili u trećoj fazi istraživanja; B: biljka stara 33 dana; C: morfološka razlika na listu koju smo uočili u trećem tjednu uzorkovanja, stariji listovi poprimili su nazubljeni oblik, dok su mlađi listovi imali okrugli oblik | 49 |
| Slika 36. <i>Tropaeolum majus</i> L.; a i b: biljka stara 40 dana; c: uzorci koje smo mjerili u četvrtoj fazi istraživanja; morfološka razlika na stabljici koju smo uočili u četvrtom tjednu uzorkovanja, mali dio stabljika poprimio je smeđu boju, dok je većina stabljika i dalje standardno svijetlo zelena..... | 50 |
| Slika 37. (A-D) Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u mladim parenhimskim stanicama korijena dragoljuba (<i>Tropaeolum majus</i> L.) u četiri različite razvojne faze (F1-F4). Lokalizacija mirozinaze tipa 1 u mladim matičnim stanicama parenhima (Slika A) i u stanicama provodnog tkiva korijena (Slika B-D). Xyl – ksilem; phl – floem; * - stanica mirozinaze. (Povećanje 40x u b-d) | 51 |
| Slika 38. Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u mladim vaskularnim stanicama stabljike (E-H) dragoljuba (<i>Tropaeolum majus</i> L.) u četiri različite razvojne faze (F1-F4). xyl- ksilem; phl – floem; * - stanica mirozinaze. (Povećanje 20x u e-h)..... | 52 |
| Slika 39. Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u mladim stanicama temeljnog tkiva u žilnom dijelu lista (I-L) dragoljuba (<i>Tropaeolum majus</i> L.) u četiri različite razvojne faze (F1-F4). xyl- ksilem; phl – floem; * - stanica mirozinaze. (Povećanje 10x u i – l)..... | 53 |
| Slika 40. Ekspresija mirozinaze tipa 1 u korijenu, stabljici i listu u različitim razvojnim fazama nakon nicanja biljke. Mirozinazna ekspresija je kvantificirana mjerenjem postotka fluorescencijske površine (% površine); ** $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ | 54 |

Slika 41. Usporedba rezultata u području korijena (Faza 1-4) dobivenih korištenjem dviju tehnika, imunofluorescencije i imunohistokemijskog bojenja. Lokalizacija mirozinaze tipa 1 u idioblastima osnovnog tkiva parenhima, koji se zovu mirozinske stanice (A-C), u stanicama parenhima ksilema (Slika 41; D-F, J-L), te u stanicama floema (Slika 41; D-F, G-I). Imunofluorescencijski signal (L) potvrđen na slici (K) označen je bijelom strelicom, dok plava strelica označava izrazit pozitivitet IHC signala u području korteksa korijena dragoljuba 56

Slika 42. Usporedba rezultata faze 4 u području stabljike dobivenih korištenjem dviju tehnika, imunofluorescencije i imunohistokemijskog bojenja. Imunohistokemijskim bojanjem potvrđen je pozitivan signal duž cijle žile floema u području stabljike (B, bijela strelica označava rezultat) 57

Slika 43. Usporedba rezultata u području lista (Faza 1-3) dobivenih korištenjem dviju tehnika, imunofluorescencije i imunohistokemijskog bojanja. Ekspresija enzima mirozinaze u području ksilema s izraženim prstenastim zadebljanjem provodnih elemenata i parenhimskom osnovnom tkivu (A-I). Izrazit pozitivan IHC signal u području floemske lisne nervature (E). Pozitivan IHC signal u području ruba stanica osnovnog parenhimskog tkiva (H). 57

TABLICE

| | |
|---|----|
| Tablica 1. Sadržaj hranjivih tvari u sjemenci i cvijetu biljke dragoljub (<i>Tropaeolum majus</i> L.) (Navarro-González i sur., 2014.; Carlson i Kleiman, 1993) | 4 |
| Tablica 2. Zastupljenost kemijskih elemenata unutar cvijeta dragoljuba (Rop i sur., 2012) | 6 |
| Tablica 3. Najvažnija povijesna otkrića tijekom istraživanja mirozinaze (Bhat i Vyas, 2019) | 15 |
| Tablica 4. Postupak dehidracije tkiva..... | 36 |
| Tablica 5. Prikaz primarnog protutijela..... | 40 |
| Tablica 6. Prikaz Dako LSAB®2 System-HRP | 41 |
| Tablica 7. Prikaz DAB supstrata | 41 |
| Tablica 8. Postupak pripreme preparata | 41 |
| Tablica 9. Postupak bojenja diaminbenzidinom..... | 41 |
| Tablica 10. Prikaz primarnog protutijela..... | 43 |
| Tablica 11. Prikaz sekundarnog protutijela | 43 |
| Tablica 12. Postupak pripreme preparata za bojenje..... | 44 |
| Tablica 13. Rezultati mjerenja uzorak za prvi tjedan uzorkovanja (Vlastiti izvor, 2022)..... | 47 |
| Tablica 14. Rezultati mjerenja uzorak za drugi tjedan uzorkovanja (Vlastiti izvor, 2022)..... | 48 |
| Tablica 15. Rezultati mjerenja uzorak za treći tjedan uzorkovanja (Vlastiti izvor, 2022)..... | 49 |
| Tablica 16. Rezultati mjerenja uzorak za četvrti tjedan uzorkovanja (Vlastiti izvor, 2022) | 50 |

1. UVOD

1.1. OPĆE KARAKTERISTIKE BILJKE DRAGOLJUB (*Tropaeolum majus* L.)

Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je samonikla, jednogodišnja, zeljasta biljka iz porodice dragoljupki (Tropaeolaceae) (Slika 1). Latinsko ime roda *Tropaeolum* potječe od grčke riječi *tropaion* što u prijevodu znači trofej ili znak pobjede. Možemo zaključiti da je naziv dobio zbog listova nalik na štitove i cvjetova nalik na šljemove (Plantea, 2023). Potječe iz Južne Amerike, s područja Anda pa se njegovim izvornim staništem smatra prostor od Bolivije do Kolumbije. Nakon europskog osvajanja većeg dijela Južne Amerike, kao kultivirana biljka donesen je prvo u Nizozemsku odakle se proširio europskim kopnom (Christenhusz i Maarten, 2012). U Hrvatskoj ga najčešće možemo pronaći duž Jadranske obale, no dobro uspijeva i na toplim i sunčanim mjestima kontinentalne regije, uglavnom po rubovima bukovih šuma. Obiluje vitaminom C i mnogim drugim biološki aktivnim tvarima koje ga čine prirodnim antibiotikom, antimikotikom, antiskorbutikom, purgativom, diuretikom i pravim eliksirom zdravlja. Uz mnogobrojne dobrobiti za zdravlje, dragoljub predstavlja ukras u vrtovima, a zbog jestivih svojstava sjemenke, lista i cvijeta često ga možemo pronaći i u gastronomiji bilo da se radi o komponenti jela ili kao fina dekoracija tanjura (Špoljar, 2016).



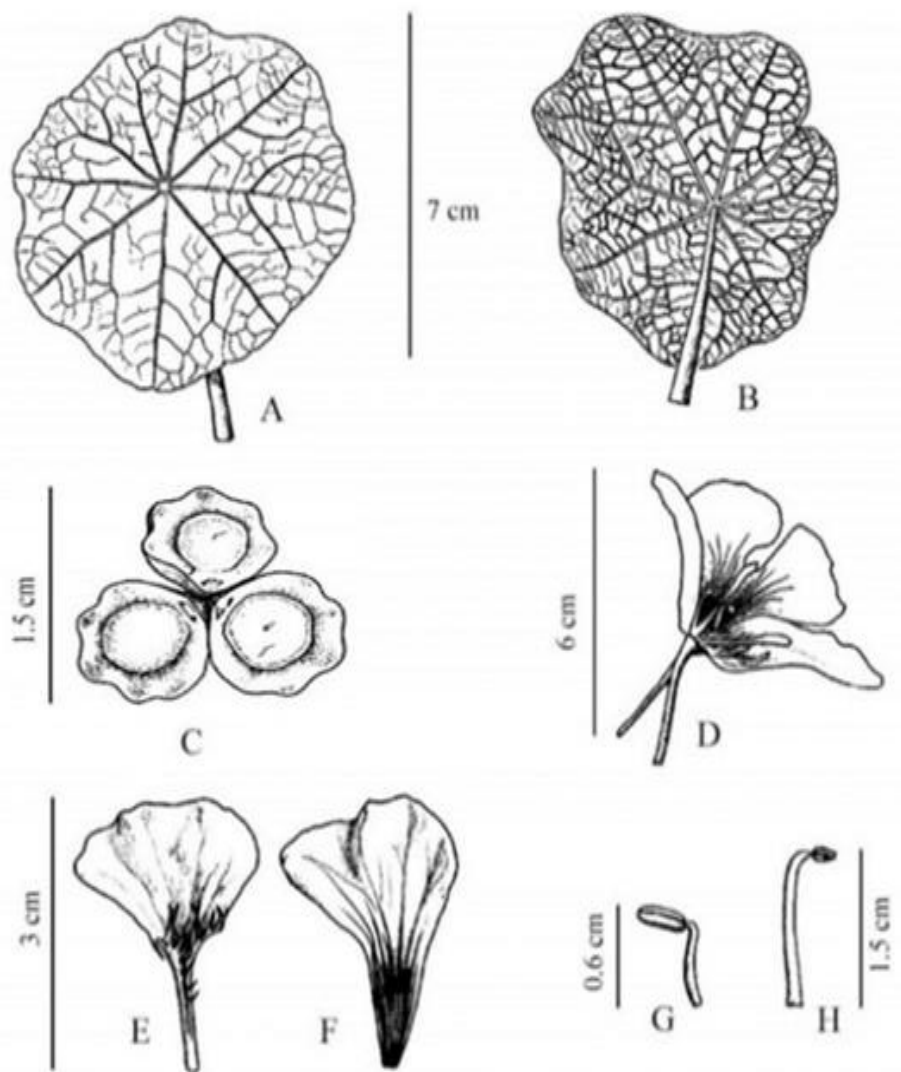
Slika 1. Biljka dragoljub u prirodnom staništu; (Objektiv, 2020)

1.1.1. Morfologija dragoljuba

Postoje mnoge podvrste ove vrste koje se međusobno razlikuju po strukturi, veličini i boji cvijeta. Stabljika je zeljasta, mesnata, razgranata i gola, a može biti penjačica ili puzačica (Slika 2). Boja stabljike varira od blijedo do tamnozeleno, a nerijetko možemo pronaći i stabljiku u smeđim tonovima. Stabljika može biti dužine od 30 cm do 5 m i debljine do 6 mm. Listovi su štitasto kružni, blago izbočenih, mekih rubova, a na stabljici su poslagani u naizmjenični raspored (Slika 2 i 3; A i B). Gornja površina listova je tamnozeleno do sive boje, dok je donja površina blijedo zelena. Veličina listova varira od 3 do 15 cm. Peteljka lista može biti perasta, ravna ili uvijena dužine od 7 – 17 cm. Vrlo su dugačke i mogu se ovijati oko drugih stabljika, biljaka ili različitih predmeta kako bi pružile potporu i obavile ulogu stabljike (Al-Robai i sur., 2022). Vjenčići su zigomorfni, hipogini, sa po 5 latica. Latice su heteromorfne, nejednake do 3,5 centimetara duljine. Tri latice imaju kandžice ili trepavice, a dvije lopatičaste latice nose vodilice za med (Slika 3; D, E i F). Boja varira od žute i narančaste do crvene, a često je i izraženija u dnu latice. Imaju blagi miris. Zajedno s čaškom čine vanjski dio cvijeta. Čaška je gamosepalozna, eliptična, žuta ili zelena, duljine do 3 cm. Cvjetovi su dvospolni te rastu na dugim peteljka iz pazušca lista koji imaju pojedinačni spiralni raspored na stabljici. Peteljka cvijeta duga je 10 – 22 cm, a vrijeme cvatnje je veći dio godine. Unutar čaške nalazi se osam prašnika različitih veličina od 1 do 1,5 cm (Slika 3; G i H). Prašnica je kremasto žuta i dvorežnjasta, veličine od 2 do 6 mm. Korijen je alorizan, sastoji se od glavnog korijena s bočnim izdancima koji rastu tako da je najmlađi bočni izdanak onaj najbliži vrhu glavnog korijena (Slika 2) (Al-Robai i sur., 2022). Plod je shizokarp i razdvaja se u tri izbrazdana merikarpa (Slika 3; C) koji su žutozeleni, a kasnije prelaze u žuto-sivu boju (Jakubczyk i sur., 2018).



Slika 2. Morfologija biljke dragoljub (Osnat, 2023)



Slika 3. Dijelovi biljke dragoljub (Al-Robai i sur., 2022)

Na slici 3 možemo razlikovati:

- (A) Ventralna površina lista,
- (B) Dorzalna površina lista s vidljivim žilicama,
- (C) Plod u obliku shizokarpa sastavljen od tri merikarpa sa sjemenkama,
- (D) Presjek cvijeta,
- (E) Latica s kandžicama i trepavicama,
- (F) Lopatičasta latica koja nosi vodilice za med,
- (G) Kratki prašnik s velikim prašnicom,
- (H) Dugi prašnik s malom prašnicom, (Al-Robai i sur., 2022)

1.1.2. Biološka svojstva dragoljuba

S obzirom da potječe s prostora Južne Amerike dragoljub je vrlo osjetljiv na niske temperature. Najbolje raste na sunčanim i lagano zasjenjenim mjestima s tlom srednje plodnosti i vlažnosti. Cvjeta i daje plodove od svibnja do studenog, a sjetva dragoljuba obavlja se oko polovice svibnja. Sjemenke niču nakon 15-20 dana, a biljka cvate nakon 8-10 tjedana. Pretjeranom upotrebom dušičnih gnojiva možemo negativno utjecati na biljku jer dovode do stvaranja većeg broja listova s manje cvjetova. Za uspješan uzgoj biljke preporuča se prozračivanje tla i uklanjanje korova (Jakubczyk i sur., 2018).

1.1.3. Kemijski sastav dragoljuba

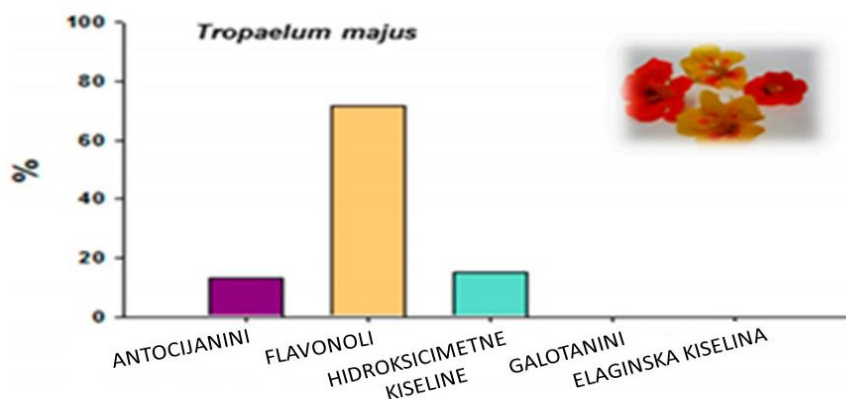
Kemijski sastav dragoljuba nije u potpunosti istražen, međutim iz dostupne literature možemo zamijetiti da postoje velika odstupanja s obzirom na dio biljke koji promatramo, boju biljke te način i mjesto uzgoja (Jakubczyk i sur., 2018).

U Tablici 1 navedeni su podatci o sadržaju hranjivih tvari biljke dragoljub u području sjemena i cvijeta koji je ujedno i najbolje istraženi dio biljke. Iz tablice možemo vidjeti očite razlike u njihovom sastavu. Dok su sjemenke bogat izvor proteina, vlakana i masti, u cvjetovima su s druge strane dominantni makronutrijenti ugljikohidrati. Ugljikohidrati u cvjetovima dijele se na jednostavne, probavljive i neprobavljive šećere. Energetska vrijednost je vrlo niska s obzirom na količinu ugljikohidrata na 100 g, a iznosi 21.44kcal/100g (Navarro-González i sur., 2014).

Tablica 1. Sadržaj hranjivih tvari u sjemenci i cvijetu biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) (Navarro-González i sur., 2014.; Carlson i Kleiman, 1993)

| Komponenta | Prosječan sadržaj u sjemenkama (%) | Prosječan sadržaj u cvjetovima (%) |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Proteini | 26.7 | 1.99 |
| Vlakna | 11.0 | 4.51 |
| Pepeo | 5.8 | 0.63 |
| Neproteinski dušik | 0.6 | - |
| Masti | 7.6 | 0.33 |
| Ugljikohidrati | - | 7.14 |
| Suha tvar | 11.27 | - |
| Kalorije | - | 21.44 kcal/100g |

Glavna komponenta jestivog cvijeća s više od 80% je voda, dok se udio bjelančevina i masti smatra niskim. Količina ukupnih ugljikohidrata, prehrambenih vlakana i minerala može varirati od biljke do biljke s obzirom na izlaganje suncu, vrsti tla i gnojidbi. Ostala svojstva cvijeta određuje sadržaj bioaktivnih spojeva poput karotenoida, fenolnih spojeva i eteričnih ulja, koji pružaju širok raspon funkcionalnih svojstava. Jestivo cvijeće sadrži fenolne spojeve različite kemijske strukture među kojima su najzastupljenije fenolne kiseline, flavonoli i antocijani (Slika 4). Antocijani osiguravaju antioksidativni kapacitet i štite biljku od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima; oni su pozitivno povezani s ljudskim metabolizmom. Osim fenolnih spojeva postoje još i karotenoidi (koji daju boju), izotiocijanati - eterična ulja (glavna komponenta mirisa cvijeća) i kružni peptidi zvani ciklotidi koji imaju razne farmakološke učinke, ali su još uvijek nedovoljno istraženi (Navarro-González i sur., 2014)



Slika 4. Identifikacija sastava jestivih cvjetova i udjela pojedinih fenolnih spojeva kao ukupnih spojeva identificiranih pomoću HPLC-DAD_ESI/MSn (Navarro.González i sur., 2014)

Biljke služe kao prirodni izvor mikro- i makro-elemenata koji se lako apsorbiraju i sprječavaju pojavu brojnih poremećaja koji proizlaze iz njihovog nedostatka. Da bi mogli ocijeniti kvalitetu pojedine biljke važno je poznavati elemente prisutne u specifičnim morfološkim dijelovima i razvojnim fazama. Cvjetovi dragoljuba su dobar izvor mikroelemenata poput kalija, fosfora, kalcija i magnezija te makroelemenata, cinka, bakra i željeza (Tablica 2).

100 g dragoljuba pokriva 73-100% preporučene dnevne doze cinka za odraslu osobu. Cink je esencijalni mikronutrijent i bitna komponenta više od 300 metaloenzima, sudjeluje u sintezi i razgradnji ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina te u metabolizmu drugih mikronutrijenata. Cink podržava normalan rast i razvoj kostiju tijekom trudnoće, djetinjstva i

adolescencije. Ima ulogu u funkcioniranju imunološkog sustava, sintezi proteina, zacjeljivanju rana, sintezi DNK i diobi stanica.

100 g cvjetova ove biljke sadrži od 0,55 do 0,64 mg željeza, što čini 3,9 do 4,6% od preporučene dnevne količine u prehrani za odrasle osobe. Također iznos pokriva 7% dnevne potrebe za fosforom, 2,5% za kalijem, 3% za kalcijem i 4% za magnezijem i 1,2 do 5,2% za bakrom.

Istraživanja su pokazala da optimalni unosi elemenata kao što su natrij, kalij, magnezij, kalcij, mangan, bakar i cink mogu smanjiti čimbenike rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti ljudi i životinja (Rop i sur., 2012).

Tablica 2. Zastupljenost kemijskih elemenata unutar cvijeta dragoljuba (Rop i sur., 2012)

| | |
|----------|-----------|
| Kalij | 245.34 mg |
| Fosfor | 48.13 mg |
| Kalcij | 33.72 mg |
| Magnezij | 14.94 mg |
| Natrij | 8.85 mg |
| Cink | 0.91 mg |
| Željezo | 0.65 mg |
| Mangan | 0.59 mg |
| Bakar | 0.12 mg |
| Molibden | 0.03 mg |

1.1.4. Ljekovita svojstva i primjena dragoljuba

Cvjetovi i listovi mogu se jesti sirovi u salatama, dajući im gorkast okus zbog sumpornih spojeva kakve nalazimo u gorušici ili luku, a mogu se i kuhati u juhama i umacima (Slika 5). U gastronomiji se dragoljub koristi i kao lijepi neobičan cvijet za dekoraciju jela. Jestivo je i sjeme biljke, koje okusom podsjeća na vrlo popularne kapare. Cvjetovi, listovi i sjemenke mogu se dodavati u ocat, pogotovo vinski, kojem upotpunjuju aromu i daju ljutkasti štih. Cvjetovi dragoljuba imaju prepoznatljiv okus poput slatke zelene salate, a listovi imaju oštar okus nalik na wasabi. Razvojem ekološke poljoprivrede potkraj prošloga i početkom ovoga stoljeća uočilo

se da je dragoljub korisno sredstvo u zaštiti od lisnih uši različitih vrsta. Često se sadi uz voćke jer privlači na sebe lisne uši s druge biljke i štiti je na vrlo neobičan način.



Slika 5. Salata od dragoljuba (Lalicki, 2012)

Kako je prilično otporna i brzorastuća biljka, sama biljka i njezini paraziti uspostavljaju ravnotežu u okolišu. Koristi se u fitoterapiji kod liječenja dišnih i mokraćnih infekcija, a znanstveno je ispitano i dokazano njegovo antibakterijsko djelovanje zbog sumpornih spojeva kakve nalazimo u biljci. U nekim studijama pokazao se i kao biljka koja štiti jetru, ali to djelovanje je ostalo u sjeni daleko poznatijih biljaka, poput sikavice ili artičoke. Biljka sadrži aktivne spojeve poput glukotropeolina koji pokazuju snažno antimikotičko djelovanje. Zbog sadržaja spojeva iz grupe izotiocijanata postoji pretpostavka da dragoljub ima i antitrombotično i protutumorno djelovanje, međutim te tvrdnje nisu još uvijek dovoljno istražene. Dragoljub je također i bogat izvor vitamina C, antocijana i polifenola, pa osim dosad navedenih ima i antioksidativno djelovanje. Poznat je i kao antiskorbutik pa je u svrhu borbe protiv skorbuta među mornarima na dugim plovidbama često bio distribuiran u luke i oceanske otoke. Zahvaljujući glikozidu dragoljub se smatra jednim od najjačih prirodnih antibiotika, antifungicida i antiseptika. U narodnoj medicini se koristi kao sredstvo za dezinfekciju i liječenje rana (Jakubczyk i sur., 2018). Dragoljub sadrži masne kiseline poput linolne, oleinske i erukinske. Linolna i oleinska spadaju u esencijalne masne kiseline čija je uloga sprječavanje bolesti srca, smanjenje gružanja krvi, sprječavanje nastanka raka te suzbijanje širokog raspona alergijskih medijatora. Oleinska kiselina naziva se još i omega-9 masna kiselina koja u ljudskom metabolizmu ima ulogu antioksidansa i temelj je za sintezu proteina, dok linolna spada u omega-6 masne kiseline s ulogom održavanja stanične membrane, funkcije mozga i održavanje normalnih uvjeta za prijenos živčanih impulsa (Calil Brondani i sur., 2016).

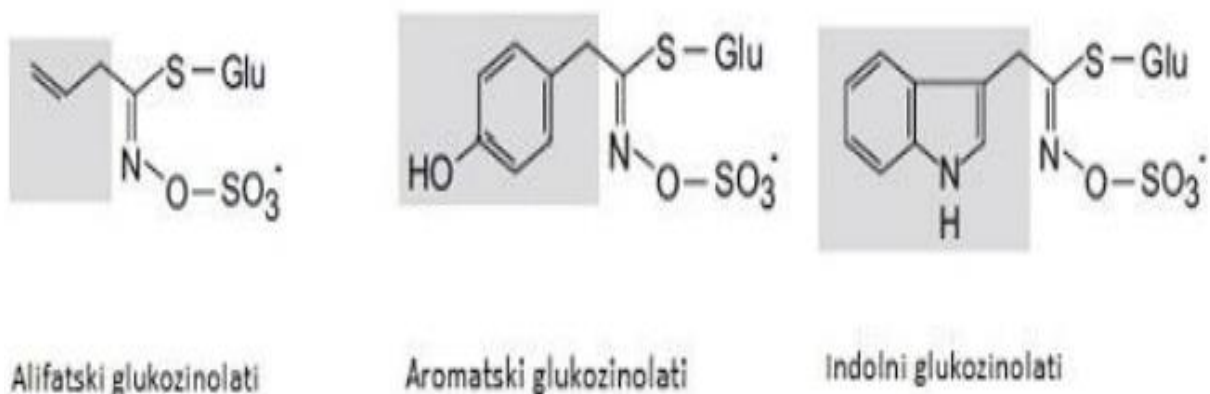
1.2. GLUKOZINOLATI

1.2.1. Glukozinolati

Glukozinolati su skupina specijaliziranih metabolita koje možemo pronaći u 16 biljnih porodica reda Brassicales. Među njima je najpoznatija porodica Brassicaceae. Ubrajaju se u specifičnu vrstu kemijskih spojeva tzv. "fitokemikalije". Neke od "fitokemikalija" koje su posebno istraživane su polifenoli, karotenoidi, folati i glukozinolati, a smatra se da imaju važnu ulogu u prevenciji različitih bolesti (Kopjar i sur., 2012).

Glukozinolati su hidrofilni spojevi kemijski i toplinski stabilni te biološki neaktivni sve dok su u stanicama biljaka odvojeni od ostalih sastojaka. Oštećenjem tkiva koje mogu uzrokovati štetočine, branje biljke, žvakanje, itd. dovodi do kontakta s enzimom mirozinazom (β -tioglukozid glukohidrolaza), što vodi prema hidrolizi glukozinolata. Hidrolizom glukozinolata nastaje niz različitih biološki aktivnih produkata kao što su izotiocijanati, cijanidi, oksazolidintioni i nitrili (Kopjar i sur., 2012). Glukozinolati i njihovi razgradni produkti vrlo su interesantni zbog svojih nutritivnih, antinutritivnih, antikancerogenih, antifungalnih i antibakterijskih svojstava (Kissen i sur., 2009).

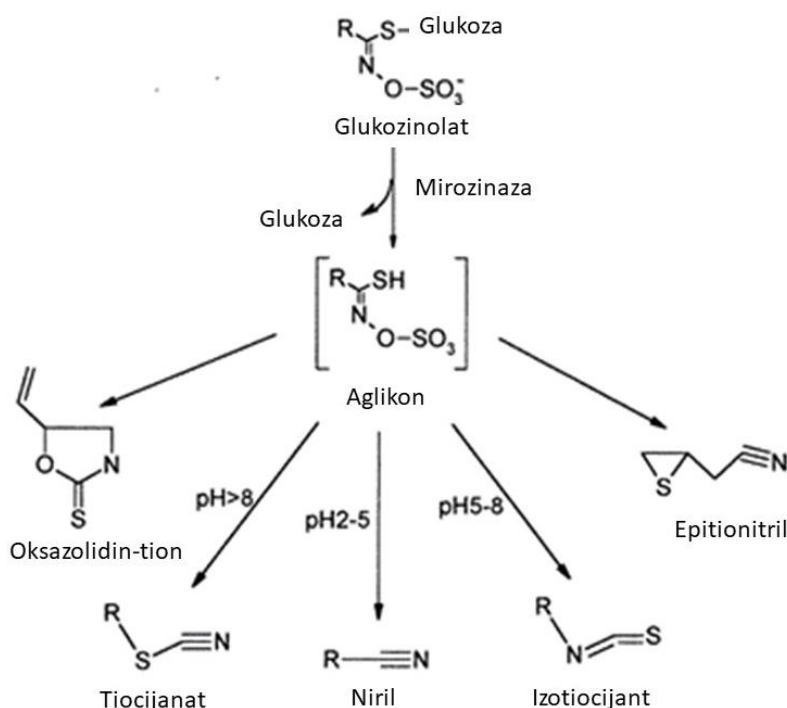
S obzirom na strukturu bočnog lanca glukozinolati se mogu podijeliti na alifatske, aromatske i indolne (Slika 6) glukozinolate (Travers-Martin i sur., 2008).



Slika 6. Podjela glukozinolata ovisno o strukturi bočnog lanca (Zekić, 2013)

1.2.2. Hidroliza glukozinolata

Oštećenjem tkiva npr. rezanjem ili žvakanjem pokreće se "mustard oil bomb" reakcija u kojoj mirozinaza hidrolizira glukozinolate i proizvodi se širok raspon produkata razgradnje (Slika 7). Hidrolizom glukozinolata odcjepljuje se glukoza – glukon i nastaju nestabilni međuprodukti – aglikon (thiohidroksimat-O-sulfonat) s kojeg se eliminira sulfat. Aglikon se potom spontano pregrađuje u različite produkte ovisno o strukturi bočnog lanca, specifičnosti (vrsti) glukozinolata, dijelu biljke gdje se glukozinolati nalaze, tretiranju biljke prije hidrolize, te uvjetima tijekom hidrolize, pH vrijednosti, koncentraciji željeznih iona i epitiospecifičnim proteinima (ESP) (Chen i Andreasson, 2001). Glukozinolati se često nazivaju prekursorima izotiocijanata i tiocijanata, spojeva koji sadrže sumpor te nitrila i indola, spojeva koji ne sadrže sumpor u svojoj strukturi (Zekić, 2013). Pri neutralnom pH (pH 7) Lössenovom pregradnjom od aglikona nastaje izotiocijanat, reaktivan, hlapljiv i mirisni produkt. Pri kiselom pH (pH < 4) kao dominantni derivat nastaju nitrili, kao i pri svim ostalim pH vrijednostima uz prisustvo fero – iona (Fe^{2+}) (Chen i Andreasson, 2001).



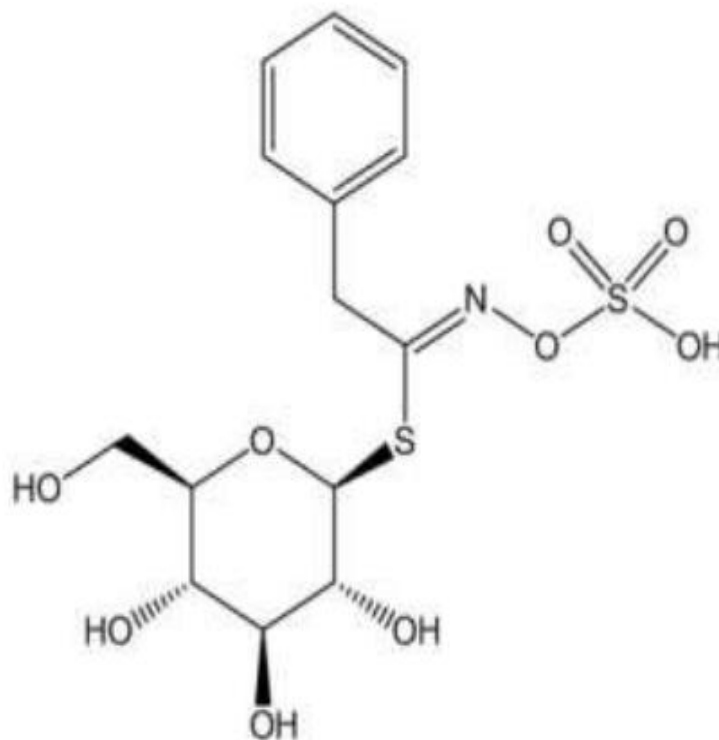
Slika 7. Nazivi i strukture produkata koji nastaju razgradnjom glukozinolata. Mirozinaza katalizira stvaranje aglikona dok se konačni produkti formiraju neenzimski ili putem epitiospecifičnog proteina (Chen i Andreasson, 2001)

1.2.3. Glukozinolati u biljci *Tropaeolum majus* L.

Za razliku od mnogih biljaka koje sadrže glukozinolati u biljci dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) možemo pronaći samo jednu vrstu glukozinolata, a to je benzil glukozinolat ili glukotropeolin (Slika 8), koji spada u aromatske glukozinolati.

Nakon konzumacije lista dragoljuba, zbog razgradnje stanica tijekom prolaska kroz probavni sustav glukotropeolin se hidrolizira i nastaje benzil izotiocijanat. Benzil izotiocijanat se apsorbira u crijevima i vezanjem glutaciona transformira u derivate merkapturane kiseline. U bubrezima se ti spojevi izlučuju u urin, gdje se velike količine rehidroliziraju da bi se ponovno dobio benzil izotiocijanat. Tako nastao benzil izotiocijanat u urinu razvija svoj antimikrobni učinak i inhibira rast bakterija koje uzrokuju upale mokraćnog sustava.

Benzil izotiocijanat ima važnu fiziološku ulogu. Ovisno o koncentraciji može imati različitu ulogu. Stimulira kemo-zaštitne mehanizme, ali u prevelikoj količini može izazvati i stanični stres. Djeluje kao inhibitor enzima faze 2 mehanizma detoksikacije i inhibira fazu 1 enzima, čime se naglašava rad stanica u kemijskoj detoksikaciji. *In vitro* studije pokazale su antimikrobno i antihelmintičko djelovanje ovog spoja, te važnu antikancerogenu ulogu jer povećava pojavu apoptoze stanica raka (Kleinwächter i sur., 2008).



Slika 8. Struktura benzil glukozinolata/glukotropeolina (Vrca i sur., 2021)

1.3. MIROZINAZA

1.3.1. Mirozinaza

Mirozinazu (tioglukozid glukohidrolazu) je prvi put otkrio A. Bussy (1839) u sjemenu crne gorušice (*Brassica nigra* L.), pronasavši "albuminu sličnu" supstancu koja sudjeluje u hidrolizi glukozinolata sinigrina. Kasnije je potvrđena u svim biljkama koje sadrže glukozinolate, u nekim tkivima sisavaca, gljiva, kukaca i mikroorganizama (Pessina i sur., 1990). U biljkama je enzim mirozinaza uvijek prisutan uz sekundarni metabolit glukozinolat osim kod porodice Koeberliniaceae koja sadrži samo stanice mirozinaze (Zekić, 2013). Neke od biljnih porodica koje sadrže glukozinolate i mirozinazu su Brassicaceae, Capparaceae, Resedaceae, Tovariaceae, Moringaceae, Gyrostemonaceae i Tropaeolaceae (Jørgensen, 1981). Priroda i specifičnosti bakterijskih tioglukozidaza manje je istraživana od biljnih, ali su među njima ipak uočene neke razlike. Askorbat inhibira bakterijsku tioglukozidazu (npr. u sojevima *Paracolobacterium* i *Enterobacter*) dok je kod biljnih enzima askorbat aktivator. Glukozinolate unesene u organizam u obliku kuhane hrane (npr. kuhano povrće) tj. bez prisustva aktivne mirozinaze, može hidrolizirati β -glukozidaza iz crijevne flore (Zekić, 2013).

Aktivnost mirozinaze u biljkama ovisi o ispitivanoj vrsti, kultivaru i biljnom organu. Najveća aktivnost mirozinaze javlja se u sjemenu i sadnicama (Zekić, 2013).

1.3.2. Struktura mirozinaze

Iz dosadašnjih istraživanja možemo zaključiti da se genetska i morfološka struktura mirozinaze mijenja kod različitih vrsti biljaka. Na temelju razlika u primarnoj strukturi polipeptidnog lanca mirozinaze su klasificirane u četiri tipa: MA, MB, MC izolirani iz *Brassica napus*, *Brassica juncea* i *Sinapis alba* i TGG izoliran iz *Arabidopsis thaliana* (Hara i sur., 2000). Razlike u veličini mirozinaza pripisuju su različitom opsegu glikozilacije, budući da proteinski dijelovi MA, MB i MC mirozinaze imaju slične molekulske mase (Rask i sur., 2000).

U sjemenkama *B. napus* i *S. alba* mirozinaza je dimerni protein s prividnom molekularnom masom od 135 – 150 kDa. Analiza cDNA klonova koji kodiraju mirozinaze iz *S. alba*, *B. napus* i *A. thaliana* pokazali su da je molekularna masa proteinskog lanca podjedinice mirozinaze od prilike 59 kDa. Sve biljne mirozinaze su glikolizirane, međutim opseg glikozilacije se mijenja ovisno o izoformi. Mirozinazu stabilizira Zn^{2+} ion. Unutar strukture dimera javljaju se

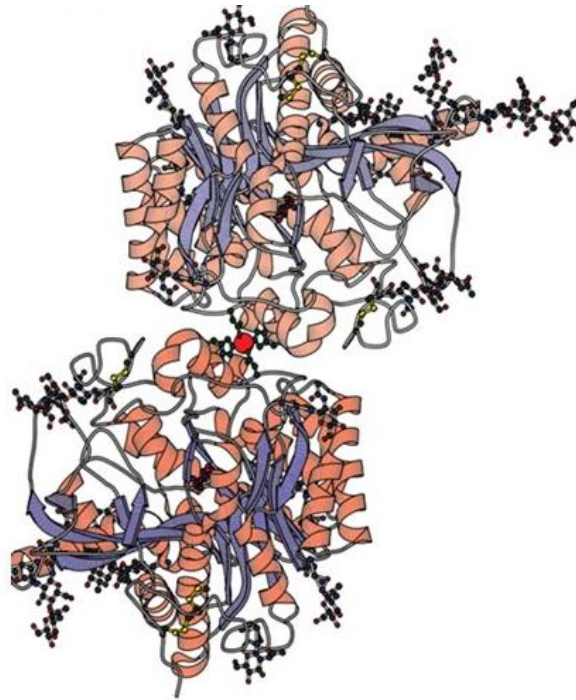
hidrofobne interakcije i nekoliko izravnih vodikovih veza, dok su druge interakcije posredovane s molekulama vode. Unutar strukture enzima možemo pronaći peptidnu vezu i tri disulfidna mosta, jedan unutarmolekulski, dok se ostala dva nalaze na N kraju molekule i smatra se da daju stabilnost enzimu. Interakcije između atoma glavnog lanca i nabijenih ostataka stabiliziraju strukturu u području petlje, tj. krajeva zavojnice. Učinkovitost te stabilizacije ogleda se u vidu termostabilnosti i stabilnošću protiv denaturacije u uvjetima s visokim sadržajem soli (Rask i sur., 2000).

Trodimenzionalna struktura enzima opisana je na mirozinazi izoliranoj iz sjemenke biljke bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) (Slika 9). Shematski prikaz podjedinice mirozinaze prikazuje (β/α) 8-bačvastu strukturu. Slika se temelji na prikazanoj kristalnoj strukturi od strane Burmeistera i sur. (1997). Iako mirozinaza ima tri disulfidna mosta i podliježe glikozilaciji, na slici je prikazana pojednostavljeno radi lakšeg razumijevanja. Kako je mirozinaza dimer, drugi monomer vezao bi se na gornji desni prikaz podjedinice gdje se nalazi Zn^{2+} vezno mjesto. Elementi sekundarne strukture β -nabrani listovi i α -uzvojnice prikazani su plavom (β -nabrani listovi) i crvenom bojom (α -uzvojnice). Ligandi Zn^{2+} prikazani su ljubičastom bojom, a ion Zn^{2+} svijetlo sivom bojom. Glukozni prsteni označeni su zeleno, dok su ostatci za prepoznavanje aglikona označeni žutom bojom. Položaj supstrata u aktivnom mjestu naznačen je molekulom inhibitora 2-deoksi-2-fluoroglukotreopelina kovalentno vezanom za nukleofil. Pogled na mirozinazu je iz ulaznog dijela enzima za supstrat. N-kraj je dolje lijevo, dok je C-kraj na dnu u sredini (Rask i sur., 2000).



Slika 9. Trodimenzionalna struktura monomera mirozinaze (Rask i sur., 2000.)

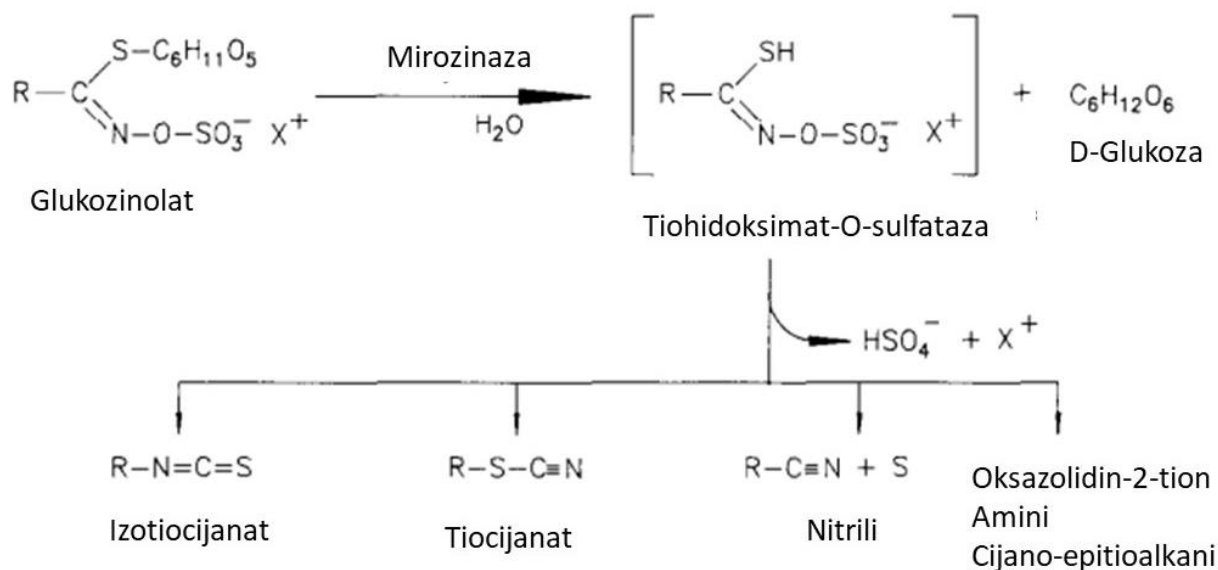
Slika 10 prikazuje glikolizirani dimer mirozinaze (ovakav dimer mirozinaze nalazi se u kristalnoj strukturi). Ion Zn^{2+} prikazan je kao crvena kugla u središtu dimera, a njegova četiri liganda prikazana su zelenom bojom. Disulfidni mostovi prikazani su žutom bojom u obliku štapića i loptica (Burmeister i sur., 1997).



Slika 10. Glikolizirani dimer mirozinaze

1.3.3. Uloga mirozinaze kod biljaka

Mirozinaza pripada velikoj skupini β -glukozidaza i to je jedini enzim koji katalizira cijepanje S-glikozidne veze (prisutne u svim glukozinolatima) koristeći askorbat kao kofaktor i mehanizam reakcije koji zadržava anomernu konfiguraciju nakon cijepanja (Bhat i Vyas, 2019). Mirozinaza katalizira hidrolizu tioglukozidne veze, tj. omogućava cijepanje veze između sumpora i glukoze u glukozinolatima, što dovodi do oslobađanja glukoze, sulfata i aglikona. Oslobođeni aglikon je nestabilan, te se spontano prerađuje dajući različite razgradne produkte (Zekić, 2013) tj. niz goitrogenih spojeva oštrog okusa i/ili mirisa poput izotiocijanata, tiocijanata, tiona, nitrila itd. ovisno o supstratu glukozinolata i uvjetima u kojima se odvija reakcija (Slika 11) (Pessina i sur., 1990). Kinetika enzimske reakcije razlikuje se od vrste do vrste, pa čak i unutar pojedine vrste (budući da se i u istoj vrsti može naći više formi ovog enzima) (James i Rossiter, 1991).



Slika 11. Opća shema hidrolize glukozinolata katalizirane mirozinazom (Pessina i sur., 1990)

Sustav mirozinaza – glukozinolat kemijski je obrambeni sustav protiv biljojeda. Mirozinaze i njihovi supstrati, glukozinolati odvojeno su pohranjeni u mirozinskim stanicama i S-stanicama. Kada biljojedi oštete biljna tkiva oslobađa se mirozinaza iz mirozinskih stanica i katalizira hidrolizu glukozinolata za proizvodnju toksičnih spojeva protiv biljojeda. Utvrđeno je da je mirozinaza vrlo stabilna na što upućuje njezina otpornost na probavu u crijevima (Bhat i Vyas, 2019).

1.3.4. Kronologija istraživanja vezanih za mirozinazu

Tablici 3 prikazuje kronološki prikaz najvažnijih povijesnih otkrića tijekom istraživanja mirozinaze. Enzim mirozinaza je već dugi niz godina predmet istraživanja mnogih znanstvenika, međutim postoje još mnoga neistražena područja vrijedna pažnje.

Tablica 3. Najvažnija povijesna otkrića tijekom istraživanja mirozinaze (Bhat i Vyas, 2019)

| Godina | Otkriće | Izvor |
|--------|---|---|
| 1840 | Mirozinaza kao protein važan u oslobađanju eteričnih ulja iz sjemenke gorušice | Bussy, 1840) |
| 1884 | Otkriće vrste stanica bogatih proteinima s diferencijalnom morfologijom, lomom svijetlosti i svojstvima bojenja | (Heinricher, 1884) |
| 1890 | Uvođenje naziva mirozinske stanica | (Guignard, 1890) |
| 1932 | Mirozin sadrži dvije aktivne jedinice: glukozidazu i tiosulfatazu | Sandberg i Holly, 1932) |
| 1959 | Mirozinazu čini jedna jedinstvena jedinica | Nagashima i Uchiyama, 1959) |
| 1961 | Vitamin C kao koenzim mirozinazi | (Ettlinger i sur., 1961) |
| 1968 | Prvo izvješće o aktivnosti mirozinaze lisnih uši (<i>B. brassicae</i>) | (MacGibbon i Allison, 1968) |
| 1972 | Otkriće postojanja višestrukih oblika mirozinaze | (Masaru i Tadao, 1972) |
| 1974 | Izolacija mirozinaze iz bakterija | (Tani i sur., 1974) |
| 1997 | Prva kristalna struktura mirozinaze iz bijele gorušice (<i>Sinapis alba</i>) | (Burmeister i sur. 1997) |
| 2000 | Mehanizam askorbata kao kofaktora | (Burmeister i sur., 2000) |
| 2005 | Kristalna struktura mirozinaze kukaca | (Husebye i sur., 2005) |
| 2014 | Transkripcijski faktor FAMA uključen je u regulaciju sudbine stanica mirozinaza i ekspresiju TGG1 i TGG2 | (Li i Sack, 2014) (Shirakawa i sur., 2014) |
| 2014 | Mirozinaza stanice se razvijaju neovisno o vaskulaturi | (Li i Sack, 2014) (Shirakawa i sur. 2016) |
| 2015 | Redoks reakcije mirozinaze | (Bhar i sur. 2015) |
| 2016 | Mirozinaza je povezana s promjenama u kutikuli | (Ahuja, 2016) |
| 2018 | Prisutnost aktivne mirozinaze u nuklearnoj frakciji | (Sehrawat, 2018) |

1.3.5. Mirozinske stanice

Od kraja 19. stoljeća vjerovalo se da je mirozinaza prisutna u posebnoj vrsti sekretornih stanica nazvanih mirozinske stanice koje uočavamo samo u ranoj fazi klijanja biljke (Bhat i Vyas, 2019). Heicrichter (1884) je otkrio posebnu vrstu stanica kod porodice Brassicaceae (Rask i sur., 2000). Ove se stanice smatraju idioblastima, a to su stanice abnormalnog oblika, veličine i sadržaja koje se razlikuju od susjednih stanica (Shirakawa i sur., 2022). Prvotno su nazvane "mirozinske cijevi", a potom "mirozinske stanice". Mirozinske stanice pojavljuju se raspršene

među stanicama korijena, stabljike, lista, peteljke, sjemenki i sadnica. Dvostrukim bojanjem s histokemijskim tehnikama koje koriste reagense poput Millonovog reagensa i antitijela protiv mirozinaze pokazalo se da mirozinske stanice sadrže mirozinazu. Kasnijim pokusima *in situ* hibridizacije pokazano je da su u mirozinskim stanicama prisutni transkripti mirozinaze i da se one vjerojatno tu i sintetiziraju (Rask i sur., 2000).

Dokazana je značajna aktivnost mirozinaze u organima bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) koji ne sadrže mirozinske stanice pa je zaključeno da enzim može postojati i van mirozinskih stanica, (Bhat i Vyas, 2019) kao raspršene, pojedinačne stanice u podzemnom i provodnom tkivu (Höglund i sur., 1992).

U tkivu mezofila iz kotiledona, oblik mirozinskih stanica može varirati od izodijametričnih stanica normalne veličine do izduženih stanica 7-8 puta većih od okolnih stanica. Mirozinske stanice u uzdužnim presjecima tkiva korteksa u hipokotiledonima izgledaju pravokutno ili kockasto, dok su u korijenu izdužene u smjeru osi organa (Rask i sur., 2000).

Unutar vakuola mirozinskih stanica nakuplja se velika količina tioglukozidnih glukohidrolaza (TGG) poznatih kao mirozinaze (Shirakawa i sur., 2022). Organeli koji ispunjavaju mirozinske stanice su sferična zrna mirozina koja sadrže homogeni materijal s elektronskom gustoćom. Veličina zrna varira od 2,5 do 10 μm , a sadrže i oleosome. Tijekom diferencijacije mirozinskih stanica, zrnca mirozina se spajaju tvoreći trabekularnu mrežu u stanici kako bi mogli međusobno komunicirati (Rask i sur., 2000).

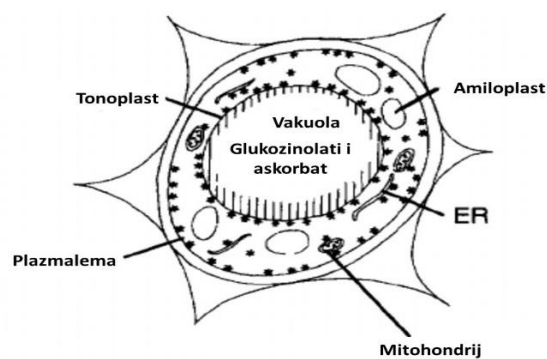
Kod biljke talijin uročnjak (*Arabidopsis thaliana* L.) otkrivena je skupina stanica (S-stanice) koje su smještene između floema u provodnom tkivu i endodermisu koje sadrže izvanredno visok udio glukozinolata. Također su otkrivene mirozinske stanice susjedne S-stanicama što ukazuje na mogućnost transporta mirozinaze uz pomoć plazmodezmija. Fizičko odvajanje supstrata i enzima ukazuje na ulogu prevencije kod stvaranja toksičnih produkata *in vivo* (Chen i Andreasson, 2001).

Karakteristična osobina mirozinskih stanica je njihov raspored duž lisne vaskulature. Mirozinske stanice se specifično razvijaju uz stanice floema (na abaksijalnoj (donjoj) strani lisne vaskulature) i nazivaju se mirozinske stanice floema. Stoga se u početku smatralo da su mirozinske stanice vrsta vaskularnih stanica, međutim 2016. provedeno je istraživanje na listovima biljke talijin uročnjak (*A. thaliana* L.) te je potvrđeno kako se mirozinske stanice diferenciraju izravno iz prizemnih meristemskih stanica i razvojno su neovisne o vaskulaturi lista (Shirakawa i sur., 2016).

Opažanje da se mirozinaza nalazi samo u vaskularnom sustavu u *A. thaliana* i različit izraz mirozinaze u sjemenu *A. thaliana* i *B. napus* dovelo je do pretpostavke da sustav mirozinaza – glukozinolat kod različitih vrsta biljaka ima različitu ulogu (Chen i Andreasson, 2001). Količina mirozinazne aktivnosti proučavana je na kultivarima nastalim iz sjemenki *Sinapis alba* L., *Brassica campestris* L. i *Brassica napus* L. od strane Hendersona i McEwena (1972), a kao rezultat navode da je mirozinazna aktivnost u *S. alba* 10 puta veća nego u *B. campestris*, a aktivnost u *B. napus* malo veća nego u *B. campestris* (Bones i Rossiter, 1996).

1.3.6. "Mustard oil bomb" hipoteza

Mnogo je radova koji nastoje objasniti položaj mirozinaze u biljnom tkivu pa su tako 1984. godine autori Lüthy i Matile postavili tzv. "The mustard oil bomb hypothesis", koja se temelji na podacima o lokalizaciji glukozinolata u vakuolama dobivenim subcelularnim frakcioniranjem mirozinskih stanica korijena hrena (*A. lappathifolia* L.). Prema toj hipotezi glukozinolati su smješteni u mirozinskim zrnima mirozinskih stanica, a mirozinaza u citoplazmi (Slika 12). To objašnjava hidrolizu glukozinolata tek kada dođe do denaturacije biljnoga tkiva, najčešće mehaničkim podražajem. Kasnijim radovima ova je hipoteza djelomično pobijena (Zekić, 2013). Upotrebom antitijela protiv mirozinaze i glukozinolata sinigrina utvrđeno je da se enzimi nalaze u unutrašnjosti mirozinskih zrnaca, a glukozinolati u proteinskim tijelima (vakuolama) u ne-mirozinskim stanicama. Hipoteza bombe s uljem gorušica jest valjana ukoliko enzim i supstrat nisu smješteni u istim stanicama kod sjemenke (Rask i sur., 2000).



Slika 12. Model "Bomba s uljem gorušice" za odijeljivanje mirozinaze, glukozinolata i askorbinske kiseline predložen od strane Lüthy i Matile (1984). Model pretpostavlja lokalizaciju mirozinaze koja je prikazana u proteinskim tijelima/vakuolama idioblasta koji idioblasta koji se zovu mirozinaza stanice (Rask i sur., 2000).

1.3.7. Uloga i lokalizacija askorbinske kiseline

Askorbinska kiselina modulira aktivnost mirozinaze (Nagashima i Uchiyama, 1959). Tsuruo i Hata (1968) postavili su model za djelovanje askorbinske kiseline na funkciju enzima mirozinaze. Askorbinska kiselina ne sudjeluje u reakciji koju katalizira mirozinaza niti je uključena u povezivanje enzimskih podjedinica. Aktivacija enzima mirozinaze posljedica je konformacijske promjene u strukturi proteina, a to dovodi do povećane brzine reakcije kada su mjesta vezivanja efektoru zauzeta. Tsuruo i Hata (1968) su pretpostavili postojanje jednog veznog mjesta za supstrat i dva za askorbinsku kiselinu. Mjesto supstrata ima dvije podjedinice, jednu za glikon i jednu za aglikon od glukozinolata. Konformacija dijela aglikona se mijenja kada askorbinska kiselina sjedne na svoje aktivno mjesto. Na taj način glukozinolat bolje pristaje na svoje mjesto. Drugo vezno mjesto za askorbinsku kiselinu je isto kao i vezno mjesto za supstrat (Bones i Rossiter, 1996). U maloj koncentraciji askorbinska kiselina ubrzava reakciju hidrolize glukozinolata uz pomoć enzima mirozinaze, dok se pri višoj koncentraciji rad mirozinaze inhibira jer askorbinska kiselina sudjeluje u kompeticiji za mjesto vezivanja supstrata na enzim. Dvostruka uloga askorbinske kiseline omogućava ko-lokalizaciju mirozinaze i glukozinolata (Chen i Andreasson, 2001).

Za razliku od drugih mirozinaza koje su karakterizirane konstitutivnom bazalnom aktivnosti u odsutstvu askorbinske kiseline, mirozinaza iz dragoljuba ne pokazuje nikakvu aktivnost kada ovaj aktivator nije prisutan (Kleinwächter i sur., 2008).

1.3.8. Lokalizacija mirozinaze u biljnim organima

Mirozinaza je do sada najviše istražena na tri biljke iz porodice kupusnjača (Brassicaceae), a to su uljana repica (*Brassica napus* L.), bijela gorušica (*Sinapis alba* L.) i talijin uročnjak (*Arabidopsis thaliana* L.) (Kissen i sur., 2009). Iako je većina do sada provedenih istraživanja usmjerena na područje sjemena i klice (embrija) postoje i neki rezultati na području korijena, stabljike i lista. O lokalizaciji mirozinaze unutar stanice, posebno u odnosu na lokalizaciju glukozinolata, raspravlja se godinama. U početku se smatralo da je mirozinaza najvjerojatnije smještena u tzv. "mirozinskim stanicama". Te su stanice pronađene u sjemenu, parenhimskom tkivu, epidermu i u zaštitnim stanicama. Brojni autori ih smatraju značajnima s taksonomskog stajališta pa pojava i raspored mirozinskih stanica služi i kao jedan od kriterija za klasifikaciju biljaka reda Capparales (Zekić, 2013).

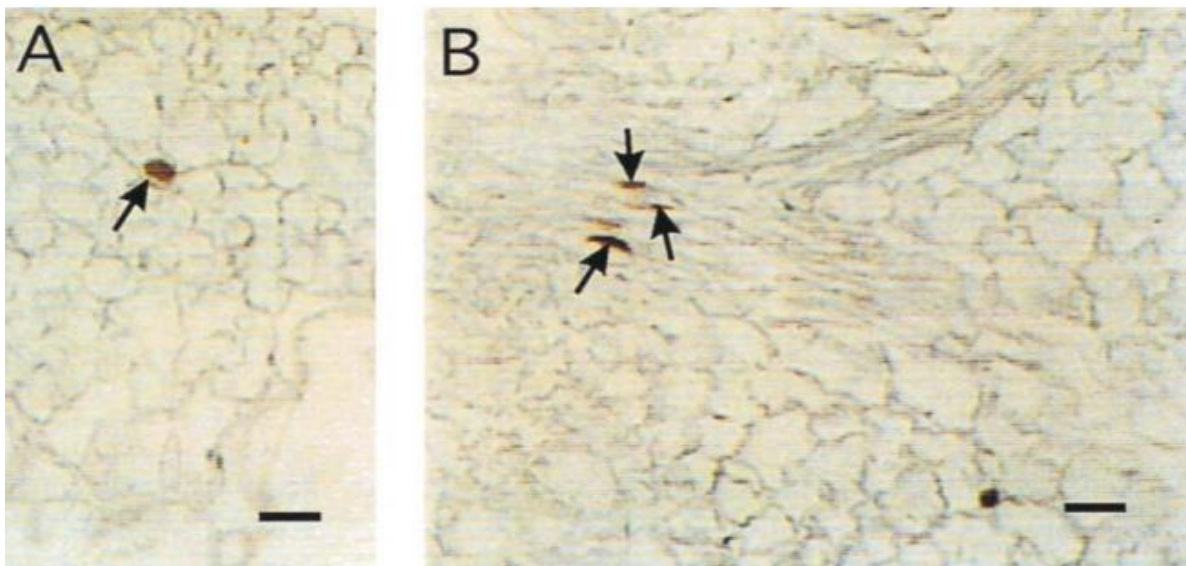
Izvješća iz različitih tkiva variraju, ali sva testirana tkiva/organi pokazuju nekakvu mirozinaznu aktivnost. Mirozinazna aktivnost se može pronaći i u kalusnom tkivu i u biljkama uzgojenim *in vitro*. Osim u korijenu, kod odraslih biljaka sadržaj mirozinaze se smanjuje i mirozinazna aktivnost postaje niža (Bones i Rossiter, 1996).

Mirozinaza u biljnom tkivu predstavlja područje interesa kod velikog broja znanstvenika već duži niz godina. Napretkom znanosti i razvojem novih tehnika rezultati su postajali bolji i vjerodostojniji. Prve korištene metode bile su bojanje Millonovim reagensom i Saffranin-fast green metode za izravnu identifikaciju mirozinskih stanica ili idioblasta koji nakupljaju te proteine. U stanicama su obojene određene globularne strukture i zrnca mirozina za koje se pretpostavlja da predstavljaju mirozinazu. Daljnjim razvojem laboratorijskih tehnika kreće promatranje enzima "*in situ*" (na izvornom mjestu) uz pomoć elektronske mikroskopije. Smatra se da je na mjestu gdje se odvija hidroliza glukozinolata (mjesto aktivnosti mirozinaze) stvoren elektronski gust talog barijevog ili olovnog sulfata, tj. dokaz o lokaciji mirozinaze u tkivu. Novija istraživanja koriste protutijela dizajnirana protiv mirozinaze kako bi otkrili položaj enzima u tkivu (Höglund i sur., 1991).

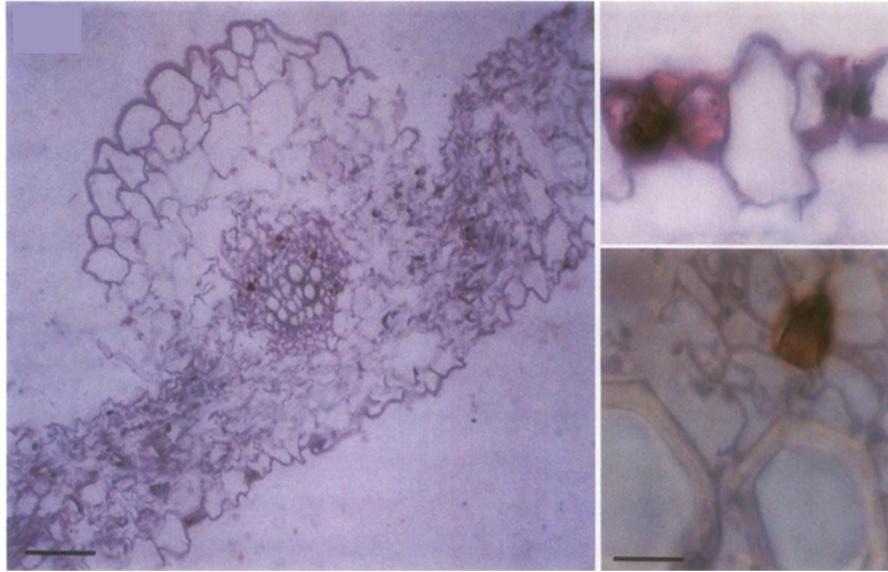
1.3.8.1. Lokalizacija mirozinaze kod uljanje repice (*Brassica napus* L.)

Mirozinaza je uglavnom lokalizirana u idioblastičnim mirozinskim stanicama koje se nalaze raspršene u većini organa. Uz pomoć 3D7 antitijela mirozinske stanice koje sadrže mirozinazu locirane su u području mezofila (Slika 13 A) i floema (Slika 13 B) lista *B. napus* (Chen i Andreasson, 2001). Tijekom razvoja sjemena *B. napus* mirozinske stanice se postupno množe dok ne postignu razinu od 2-5% od ukupnog broja embrionalnih stanica, a ovisno o fazi razvoja u kojoj se biljka nalazi dolazi i do različitog rasporeda mirozinskih stanica u različitom tkivu. Velik broj stanica koje sadrže mirozinazu nalaze se u staničnom sloju osi i kotiledona. U uzorku sjemena mirozinaza je prvi put pronađena dvadeset dana nakon oplodnje, a količina mirozinaze rasla je do tridesetog dana kada se ustalila. Otkriveno je da se u embrionalnoj fazi (klica) 39 dana nakon oprašivanja mirozinaza najviše lokalizirala u području citoplazme i nakupljena u obliku tjelešca ili na periferiji mirozinskih stanica. Raspodjela mirozina u klici ostala je nepromijenjena dva dana nakon klijanja, dok se osam dana nakon klijanja mirozinaza počinje nakupljati u vakuolama stanica, a bojanjem kotiledona otkriveno je da se mirozinaza nalazi u novonastalim zaštitnim stanicama, u manjem broju raspršenih stanica parenhima. Prilikom bojanja mladih listova pozitivan signal za mirozinske stanice pronađen je u području zaštitnih

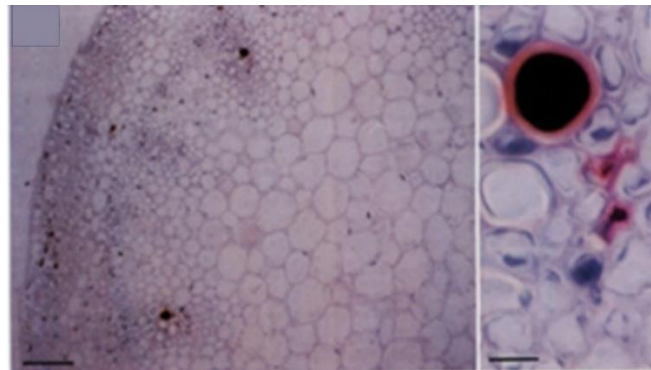
stanica, parenhima i u stanicama vaskularnog tkiva u blizini floema (Slika 14), dok kod starijih listova i latica u zaštitnim stanicama mirozinaza nije bila prisutna. Kod stabljike je većina enzima lokalizirana u stanicama ksilema i korteksa (Slika 15), a u korijenu su stanice mirozinaze uglavnom smještene u korteksu (Slika 16) (Höglund i sur., 1991). Mirozinaze su također lokalizirane u stanicama pridruženim vaskularnom tkivu u području kotiledona, radikala, hipokotiledona i korijena, a takve se stanice najčešće nazivaju floem prateće stanice (Bones i sur., 1991). S obzirom da se mirozinaza javlja u zaštitnim stanicama u određenim tkivima pokazuje da aktivnost za odgovarajuće gene nije ograničena na mirozinske stanice (Höglund i sur., 1991).



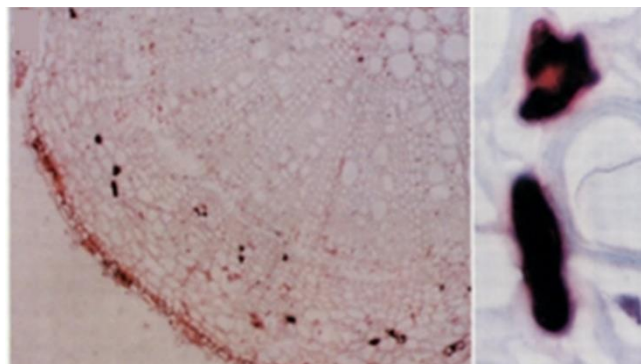
Slika 13. Imunohistokemijska analiza ekspresije mirozinaze u listu *B. napus* koristeći monoklonoalno 3D7 anti-mirozinaza antitijelo; 13 A - mezofil; 13 B - floem; stanice koje sadrže mirozinazu označene su strelicom (mjerna skala=10 μ m) (Höglund i sur., 1991)



Slika 14. Lokalizacija mirozinaze u listu uz pomoć monoklalnog 3D7 antitijela; na slici je prikazan signal u zaštitnim stanicama i stanicama parenhima vaskularnog tkiva (Höglund i sur., 1991)

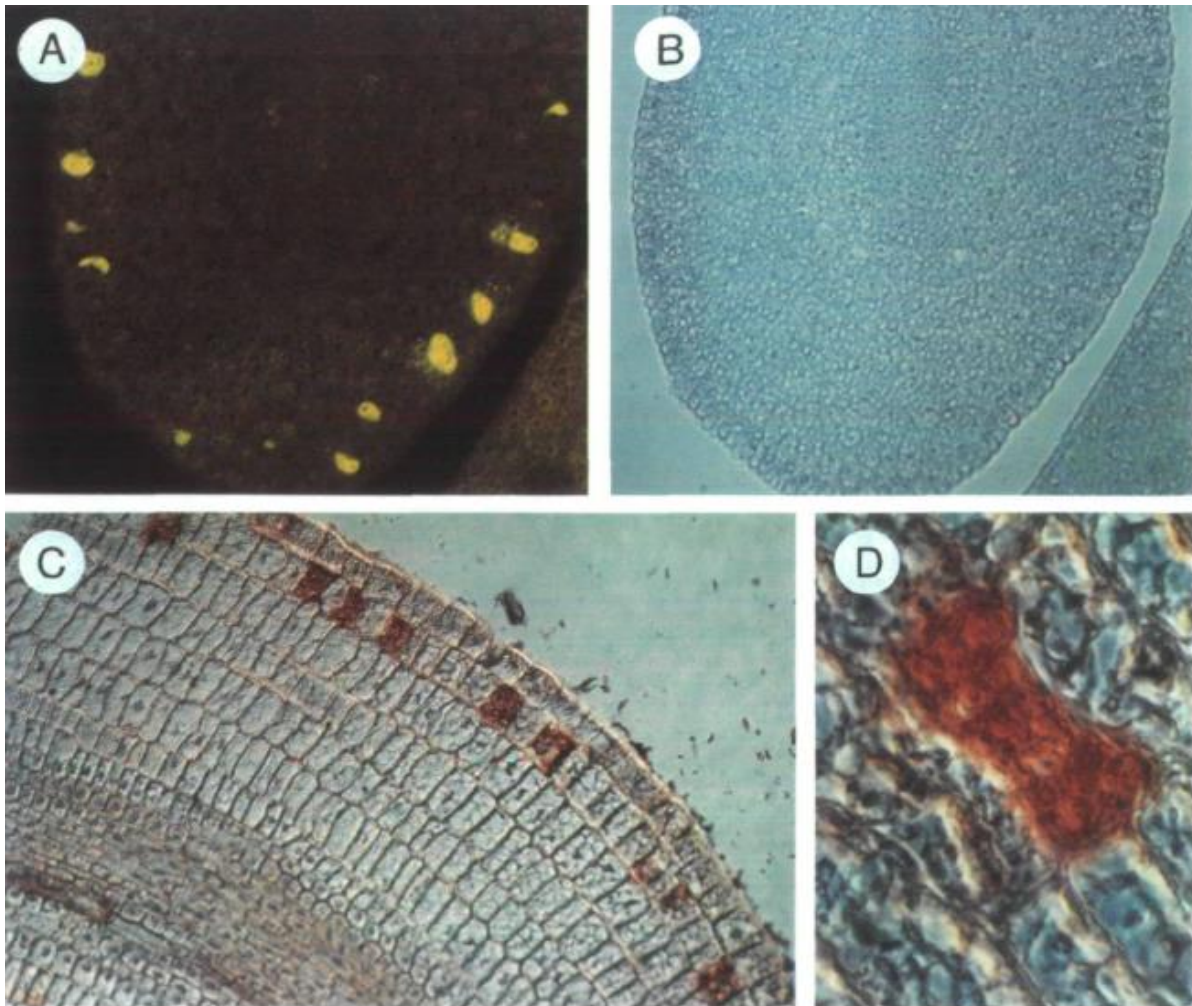


Slika 15. Lokalizacija mirozinaze u stabljici uz pomoć monoklalnog 3D7 antitijela; prikaz signala u područjima ksilema i korteksa stabljike (Höglund i sur., 1991)



Slika 16. Lokalizacija mirozinaze u korijenu uz pomoć monoklalnog 3D7 antitijela; prikaz signala u području korteksa korijena (Höglund i sur., 1991)

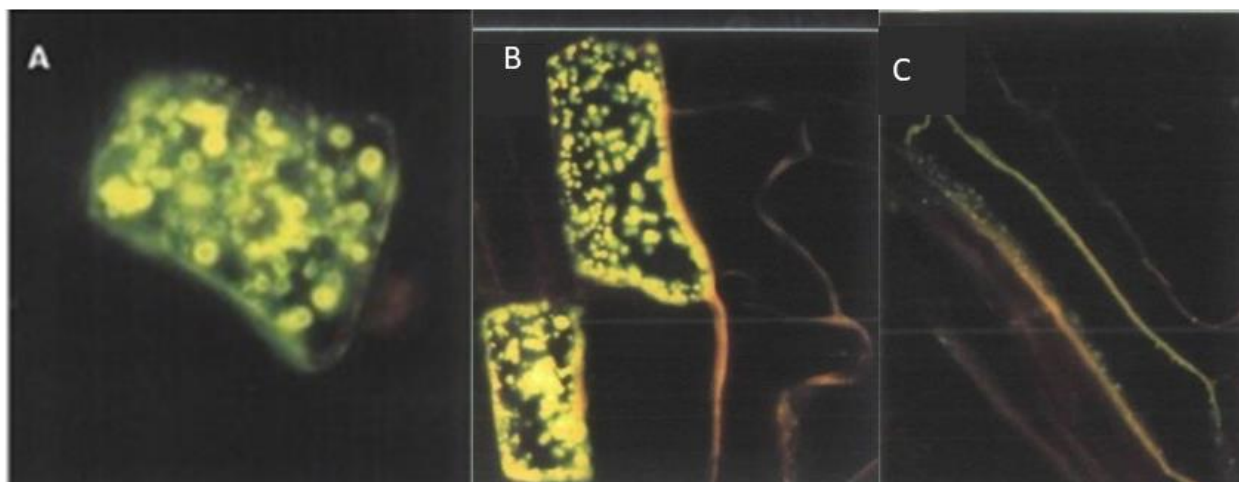
Fluorescentnom mikroskopijom dokazano je da je za mirozinazu tipična specifična lokalizacija na ograničenom broju stanica. Mirozinske stanice razlikuju se od okolnih stanica tkiva. Veliki dio mirozinskih stanica nalazi se na vanjskom dijelu kotiledona, hipokotiledona i korijena (Slika 17 A-D) (Bones i sur., 1991).



Slika 17. Distribucija i morfologija mirozinskih stanica u primarnom korijenu nakon 4 sata imbibicije i korijenu sadnice *Brassica napus*. Imunofluorescencijsko označavanje mirozinske stanica na periferiji primarnog korijana (A); Fazno kontrastna mikroskopija iste regije (B); imunoperoxidazno označavanje iste regije u području korijena (C i D) (A i B x100; Cx240; Dx2000) (Bones i sur., 1991)

Tijekom rasta i starenja biljnih organa smanjuje se prisutnost fluorescentnih biljega. Broj mirozinskih stanica opada tijekom prvih nekoliko dana rasta biljke. U području korijena u početku rasta možemo vidjeti mirozinske stanice s homogenim mirozinskim zrnima koja se nalaze po cijeloj stanici (Slika 18 A). Dva dana nakon sijanja mirozinska zrnca postaju manje

homogena i pojavljuju se veće vakuole (Slika 18 B). Daljnjim rastom mirozinska zrnca mirozinske stanice postaju sve raspršenija i odlaze na periferiju dok vakuole postaju sve veće (Slika 18 C) (Bones i sur., 1991).



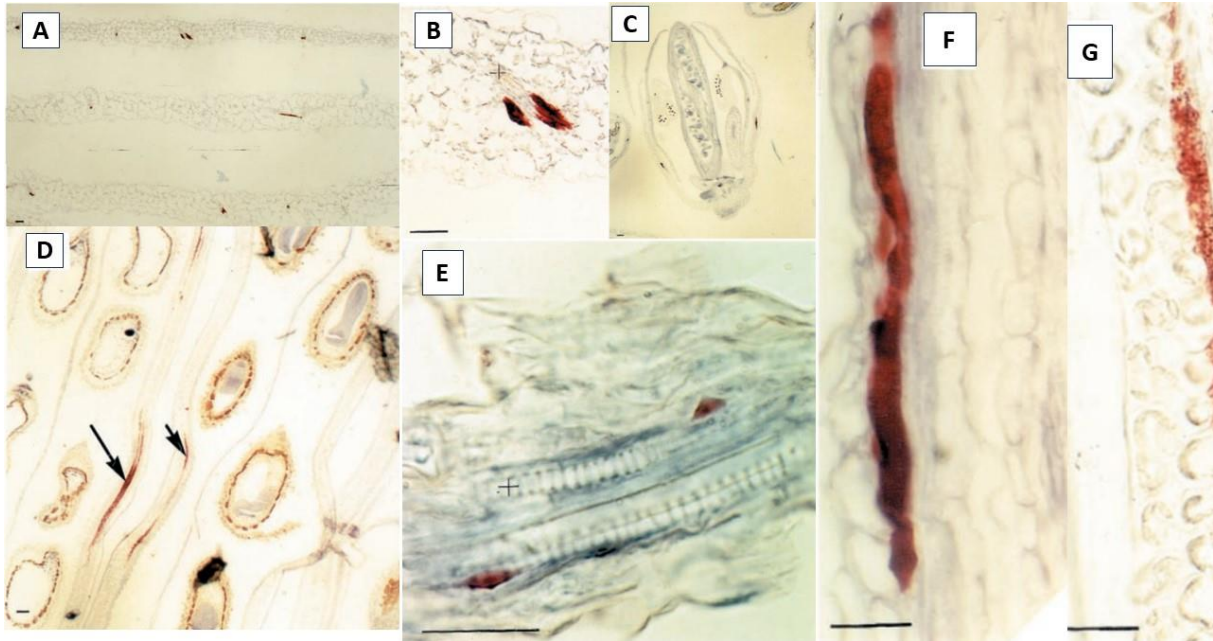
Slika 18. Morfološke promjene zrna mirozineze u korijenu 4 sata nakon imbibicije (A) i 2 dana nakon sijanja (B) i 14 dana nakon sijanja (C). Sve slike predstavljaju imunofluorescentno označavanje mirozinaze (A x770; B x390; C x300) (Bones i sur., 1991)

1.3.8.2. Lokalizacija mirozinaze u talijinog uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.)

Mirozinaza se i kod talijinog uročnjaka javlja odvojeno od glukozinolata. Imunocitokemijska analiza *Arabidopsis thaliana* dokazala je da je mirozinaza lokalizirana isključivo u mirozinskim stanicama floemskog parenhima i zaštitnim stanicama vegetativnog tkiva dok u osnovnom tkivu nisu otkrivene mirozinske stanice za razliku od *B. napus*. Glukozinolati su odvojeni u divovske S-stanice koje se nalaze uz floem (Andersson i sur., 2009).

Korištenjem monoklonalnih antitijela 3D7 i poliklalnog zečjeg antiseruma K505 dobiveno je identično obojenje idioblastičnih stanica u floemu parenhima svih istraživanih tkiva. U listovima zrele biljke starim 25 dana pronađena je mirozinaza u stanicama simetrično postavljenim u parenhimu floema (Slika 19; A i B). U cvjetnim pupoljcima koji se sastoje od latica i čaške u razvoju nađena je mirozinaza (Slika 19; C i F). U plodovima starim 10 dana mirozinaza je prisutna u stanicama floema koje su građom bile dosta veće od okolnih stanica (Slika 19; D i G). Nasuprot tome nisu pronađene mirozinske stanice u embrionalnom razvoju, klici niti u zreлом sjemenu. Prikazane su samo sadnice stare pet dana koje imaju malo floemskog parenhima s mirozinskim stanicama u osi (Slika 19 E), dok je sadnicama starim 9 dana mirozinaza otkrivena u velikim stanicama floemskog parenhima kotiledona. Bojanjem

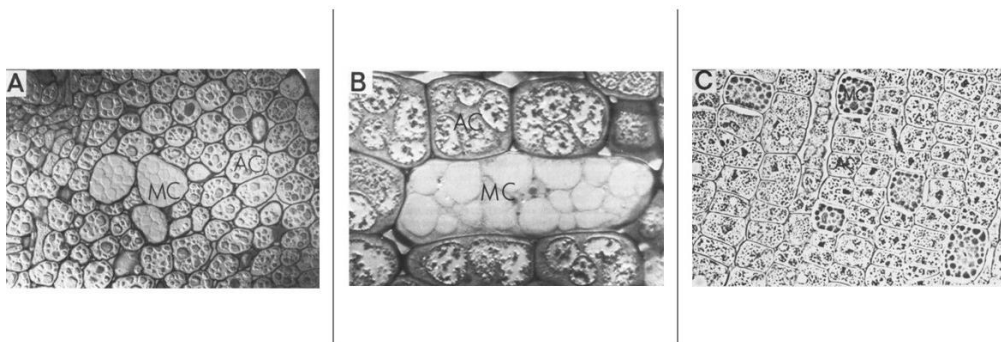
starijih dijelova biljke poput plodova primjećuje se veća granulacija mirozinskih stanica (19 G), dok je kod mlađeg tkiva poput lapova bojanje homogeno (19 F). Svjetlosnom mikroskopijom mladog lišća dokazano je da su mirozinske stanice uvijek bile i šire i duže od stanica floemskog parenhima, te često dolaze u parovima (Andréasson i sur., 2001).



Slika 19. Imunohistokemijska analiza mirozinaze u vrste *Arabidopsis thaliana* L. korištenjem 3D7 antitijela. U potpuno zrelih listovima biljke stare 25 dana, mirozinaza je pronađena u parovima idioblastičnih stanica u floemu parenhima (A i B). U cvjetnim pupoljcima neke stanice sadrže mirozinazu (C i F) kao i latice i lapovi (C). U 10 dana starim plodovima idioblasti koji isadrže mirozinazu u parenhimu floemskih stanica veći su od okolnih stanica i njihov sadržaj je više granuliran (D i G). Strelice pokazuju stanice s dugom ekspresijom mirozinaze. Žućkasto obojenje izvan endosperma zadržava neoksidirani supstrat i stoga se smatra pozadinom (E). U klici staroj 5 dana otkrivene su stanice koje sadrže mirozin među stanicama floema u području cvjetne osi. Ksilen je označen s +, a ljestvica veličine odgovara 10 μm (Andréasson i sur., 2001)

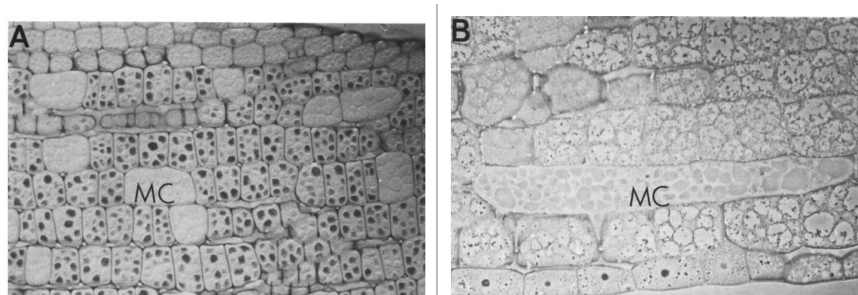
1.3.8.3. Usporedba lokalizacija i oblika mirozinaze kod rotkvice (*Raphanus sativus* L.), bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i ognjice (*Iberis amara* L.)

Slika 20 prikazuje mirozinske stanice u različitim biljnim tkivima: rotkvice (*Raphanus sativus* L.), bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i ognjice (*Iberis amara* L.). U tkivu mezofila iz kotiledona oblik mirozinske stanice može varirati od izodijametričnih stanica normalne veličine (Slika 20 A) do izdružene stanice s površinom 7 – 8 puta većom od okolnih stanica sličnih aleuronima (Slika 20 B). Oba oblika mogu se pronaći u rotkvi i bijeloj gorušici. Kod ognjice su mirozinske stanice iste veličine kao i okolne stanice (Slika 20 C) (Bones i Iversen, 1985).



Slika 20. Svjetlosna mikroskopija stanica mezofila u kotiledonima (A i B) i u stanicama korijenovog vrška (C) izolirane iz 24 sata starih sadnica biljaka A – rotkvice (*Raphanus sativus* L.), B - bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i C - ognjica (*Iberis amara* L.) uzgojene na svjetlu; MC – stanice mirozina; AC – stanice slične aleuronu; A: x 510, B: x 760. (Bones i Iversen, 1985)

Mirozinske stanice u uzdužnim presjecima iz tkiva kore u hipokotiledonima bijele gorušice izgledaju pravokutno ili kockasto (Slika 21 A), dok su mirozinske stanice u podrčju kore vrha korijena rotkvice izdužene u smjeru osi organa (Slika 21 B). Takve stanice se mogu uočiti već nakon 2 sata imbibicije, a dodatno će se izdužiti simplastičnim rastom (Bones i Iversen, 1985).



Slika 21. Svjetlosna mikroskopija uzdužnih presjeka tkiva kore u hipokotiledonima A – bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) nakon 2 sata imbibicije na svjetlu i stanice korteksa vrha korijena B

– rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon 24 sata na svjetlu; MC – mirozinske stanice; A: x 400, B: x 410. (Bones i Iversen, 1985)

Na tkivu rotkve (*Raphanus sativus* L.) provedena su istraživanja za ekspresiju gena mirozinaze, aktivnost enzima i ukupan sadržaj glukozinolata u različitim tkivima rotkvice. Najveća aktivnost mirozinaze i ukupnog sadržaja glukozinolata javila se u području kotiledona, a potom u području hipokotiledona i na posljertku u području korijen. Ekspresija gena za mirozinazu, produkta gena i glukozinolata bilo je više u području korijena, nego u području lista. U području korijena bili su većinom lokalizirani u kori (Bones i Iversen, 1985).

1.3.8.4. Western blot analiza proteinskog ekstrakta iz uljane repice (*B. napus* L.)

Western blot analiza proteinskih ekstrakata iz različitih organa uljane repice (*Brassica napus* L.) pri različitim razvojnim fazama pokazala je da su geni mirozinaze izraženi na način koji je specifičan za razvoj tkiva. Pretpostavlja se da su mirozinaze odgovorne za prirodni promet glukozinolata u intaktnom tkivu u određenoj razvojnoj fazi, npr. klijanje i općenito imaju utjecaj na regulaciju rasta. Drastično smanjenje sadržaja glukozinolata tijekom ranog razvoja stadija biljke *B. napus* u skladu s ekspresijom mirozinaze i smanjenjem razine glukozinolata u lišću nakon njegovog sazrijevanja može se pripisati hidrolizi glukozinolata mirozinazom radi samozaštite biljke. Mirozinaze podliježu nutritivnoj modulaciji, indukciji plavim osvjetljenjem, te se njihov sadržaj smanjuje nakon tretmana salicilnom kiselinom. Iako regulacijski mehanizmi uključeni u ekspresiju mirozinaze i *in vivo* razgradnju glukozinolata nisu jasni, pojačana razgradnja glukozinolata pod abiotičkim i biotičkim stresom može dovesti do remobilizacije sumpora i/ili dušika i učinkovitih odgovora na stresne uvjete (Chen i Andreasson, 2001).

1.3.9. Mehanizam djelovanja mirozinaze

Mirozinske stanice dobile su ime po skladišnim proteinima, mirozinazama, koje se još nazivaju i "mirozinsko zrno" i tioglukozid glukohidrolaza (TGG). Supstrati mirozinaza su glukozinolati, spojevi bogati sumporom koji se nakupljaju u drugoj vrsti specijaliziranih stanica, S-stanicama. Kod normalnih razvojnih uvjeta, enzimi i supstrati se ne susreću jer su razdvojeni u različitim vrstama stanica. Nakon napada biljojeda dolazi do djelovanja enzima mirozinaze koja cijepa vezu između sumpora i glukoze u glukozinolat i dolazi do proizvodnje toksičnih spojeva poput izotiocijanata. Ova obrambena strategija zove se "mustard oil bomb" i jedan je od kritičnih

čimbenika za staništa biljaka reda Brassicales. U modelnoj biljci *A. thaliana* postoje dvije vrste mirozinaza pohranjenih u mirozinskim stanicama, a to su TGG1 i TGG2 (Shirakawa i sur., 2022).

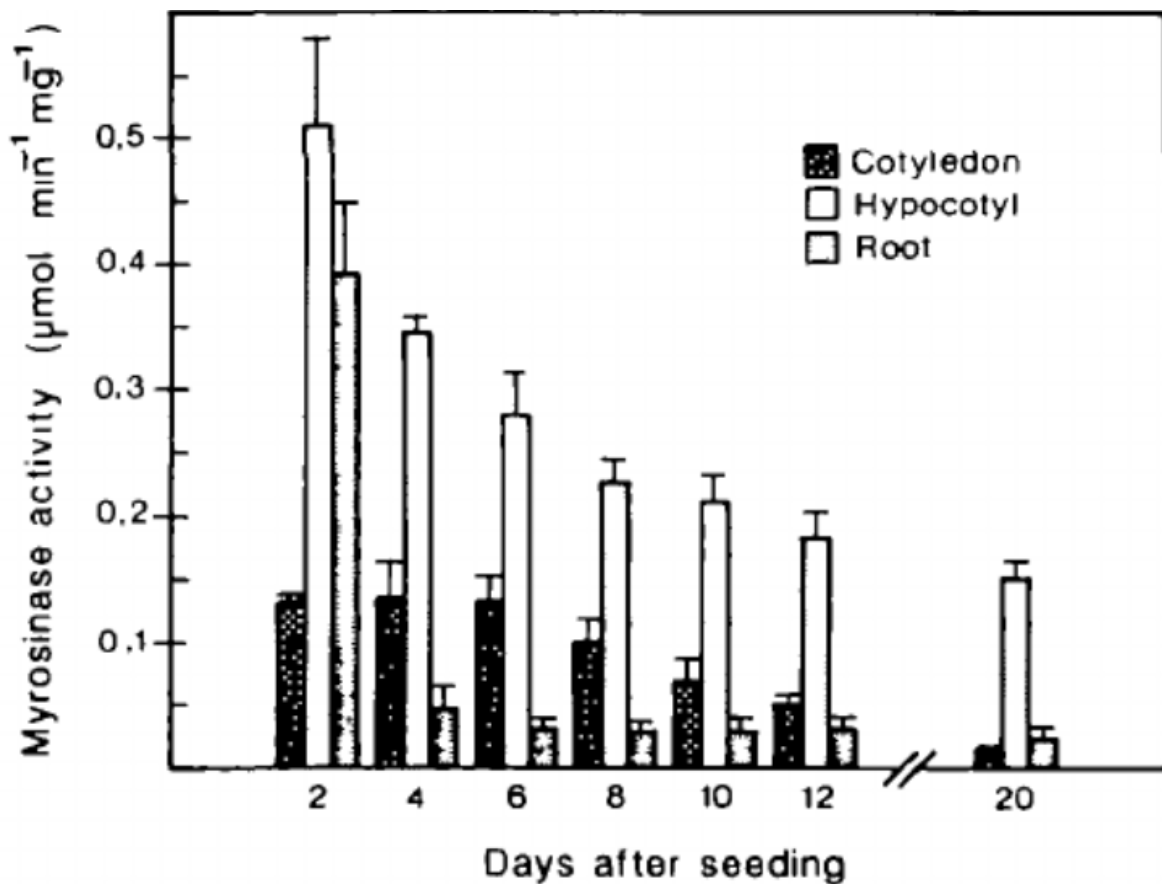
Mirozinaze (β -glikozidaze) djeluju stvaranjem kovalentnog intermedijera tijekom katalize. Reakcija se odvija u dva koraka. Prvi korak započinje napadom nukleofila na enzim koji tvori kovalentni glikozil enzim intermedijer nakon cijepanja eterske (glikozidne) veze. Drugi korak počinje enzimatskom aktivacijom molekule vode što dovodi do oslobađanja šećera i obnavljanja enzima za pokretanje novog kruga katalize. To omogućuje ispitivanje nukleofila u glikozidima budući da molekula fluoriranog šećera tvori kovalentni intermedijer s enzimom koji je hidroliziran vrlo sporo što ukazuje da je enzim još uvijek katalitički kompetentan (Rask i sur. 2000).

1.3.10. Mirozinazna aktivnost u sjemenu, sadnicama i kod odraslih biljaka uljane repice

Prema istraživanju (Bones, 1990) koji uspoređuje aktivnost mirozinaze u 21-om uzgojenom kultivaru biljke uljane repice (*B. napus* L.) vidi se da je aktivnost mirozinaze osim među biljkama različitih vrsti također vrlo različita i kod zasebnih kultivara iste vrste. Također uspoređujući 14 kultivara uljane repice može se primijetiti da je ukupna mirozinazna aktivnost veća u ljetnim mjesecima, nego u zimskim, a među kultivarima s visokim i niskim glukozinatnim sadržajem nije zamijećena značajna razlika (Bones, 1990).

Mirozinazna aktivnost u sadnicama *B. napus* varira s obzirom na promatrani organ i starost promatrane biljke. Mirozinazna aktivnost određena korištenjem čiste dijalize enzimskog preparata uvijek je viša u području hipokotiledona nego u području korijena i kotiledona u istoj fazi razvoja. Prema podacima iz grafa (Slika 22) na području hipokotiledona maksimalna mirozinazna aktivnost uočena je 2 dana nakon sijanja, a potom se prati snižavanje aktivnosti u gotovo hiperboličnom obliku sljedećih osamnaest dana. U području kotiledona aktivnost mirozinaze je gotovo konstantna i prvih šest dana s polaganim padom aktivnosti prema dvadesetom danu, dok je u području korijena uočeno značajno smanjenje aktivnosti mirozinaze u periodu između drugog i četvrtog dana od sijanja, te potom nastupa stabilni period uz jako nisku mirozinaznu aktivnost (Bones, 1990).

Kod odraslih biljaka također je zamijećena mirozinazna aktivnost u svim uzorcima različitih organa. Kod lista, stabljike i cvata uočene su vrlo male količine mirozinazne aktivnosti. Mladi listovi u blizini vršnog pupoljka obično su pokazivali jaču mirozinaznu aktivnost od starijih listova. Za razliku od toga jača mirozinazna aktivnost bila je prisutna u starijim dijelovima stabljike. Najjača mirozinazna aktivnost kod zrele biljke bila je izmjerena u gornjim dijelovima korijena (Bones, 1990).

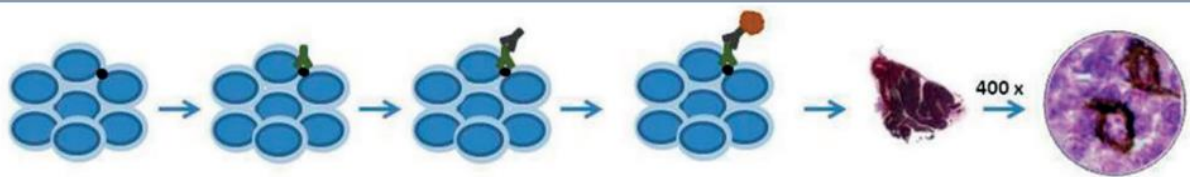


Slika 22. Mirozinazna aktivnost u organima sadnice vrste *B. napus* L. za vrijeme od 20 dana nakon sijanja (Bones, 1990)

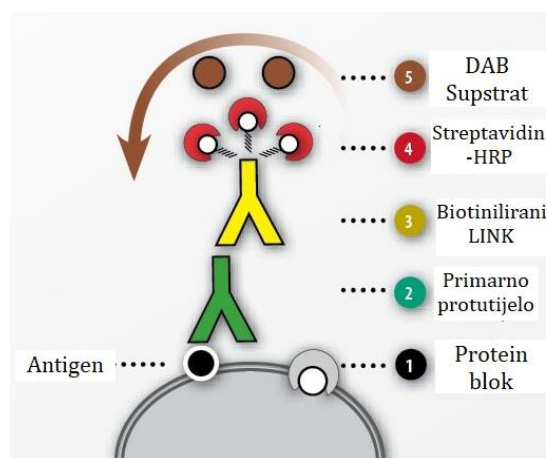
1.4. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJENJE

Imunohistokemijsko bojenje je metoda za detekciju prisutnosti i lokalizacije antigena u rezovima tkiva s pomoću specifičnih antitijela, odnosno kompleta reagensa koji omogućuju vizualizaciju reakcije antigen/antitijelo. Princip nastajanja antitijela kod kralježnjaka osnova je svih imunoenzimatskih metoda koje se primjenjuju u laboratorijskoj dijagnostici. Ovakav način vizualizacije, koji uključuje sekundarno antitijelo koje nosi enzim potreban za vizualizaciju specifične reakcije, najčešće je korištena varijanta metode u rutinskim dijagnostičkim laboratorijima.

Ova metoda uključuje detekciju epitopa (dijela antigena koji antitijelo prepoznaje) u uzorku tkiva primjenom primarnog antitijela koje može vezati epitope s visokom specifičnošću. Nakon vezanja epitopa i primarnog antitijela dodaje se sekundarno antitijelo koje može vezati primarno antitijelo također s visokom specifičnošću. Na sekundarno antitijelo vezana je molekula za otkrivanje, koja nakon stvaranja kompleksa primarno antitijelo/sekundarno antitijelo omogućava vizualizaciju istraživanog epitopa, tj. antigena (Vukoja i sur., 2017).



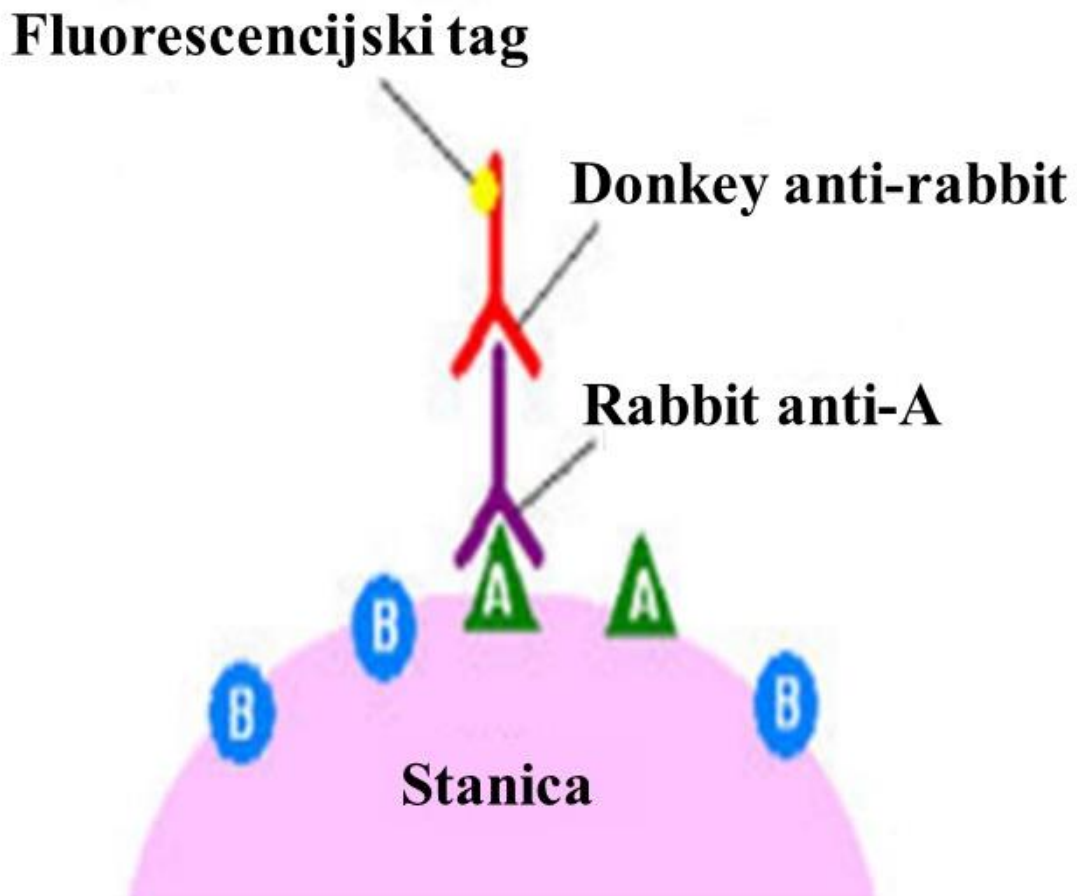
Slika 23. Shematski prikaz postupka i slika mikroskopskog preparata nastalog klasičnim imunohistokemijskim bojanjem (Vukoja i sur., 2017)



Slika 24. Shematski prikaz imunohistokemijskog označavanja antigena (Celnovte, 2023)

1.5. NEIZRAVNA IMUNOFLORESCENCIJA

Neizravna imunofluorescencija je metoda u kojoj se prvo primarno protutijelo (protutijelo koje se veže na antigen i nije označeno) veže na ciljno mjesto, a potom se sekundarno protutijelo (koje je obilježeno i ciljano usmjereno na Fc fragment primarnog protutijela) veže na primarno protutijelo. Važno je da sekundarno protutijelo koje se koristi bude ciljano usmjereno na IgG životinjske vrste u kojoj je primarno protutijelo proizvedeno (npr. ako je primarno protutijelo IgG mišjeg porijekla onda sekundarno protutijelo mora biti usmjereno na Fc fragment IgG miša). Ova metoda je osjetljivija zbog pojačavanja signala putem sekundarnog protutijela (Medri, 2023).



Slika 25. Indirektna metoda bojanja imunofluorescencijom (Medri, 2023)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Mirozinaza je enzim karakterističan za porodicu Brassicaceae, gotovo uvijek prisutan uz sekundarni metabolit glukozinolat, a osim kod biljaka pronađen je i u tkivima kukaca i mikroorganizama. Iz dosadašnjih istraživanja potvrđena su brojna pozitivna djelovanja kompleksa glukozinolat – mirozinaza pa se javila potreba za daljnjim istraživanjem prisutnosti tog enzima i u drugim biljnim vrstama. Cilj ovog istraživanja bio je potvrditi postojanje enzima mirozinaze tipa 1, locirati i izračunati količinu imunoekspresije u korijenu, stabljici i listu biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) kroz četiri različite faze rasta biljke (unutar 4 tjedna). Prilikom provođenja istraživanja praćen je rast testirane biljke kako bi se mogla usporediti količina prisutne mirozinaze s procesom starenja biljke.

3. MATERIJALI I METODE

Za provedbu eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištena je biljka dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) uzgojena iz sjemena (Slika 26) u termoregulacijskoj sobi u uvjetima 12 sati dan/12 sati noć. Tkivo je uzorkovano četiri uzastopna tjedna u pravilnim razmacima kako bi se dobili komadići tkiva u različitim razvojnim fazama nakon rasta. Uzorkovana su sva tri vegetativna dijela biljke (korijen, stabljika i list), a dimenzije uzoraka tkiva su bile 0,5cm x 0,5cm.



Slika 26. Sjeme biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) korišteno za uzgoj u kontroliranim uvjetima (Vlastita fotografija, 2023)

3.1. IZRADA HISTOLOŠKIH PREPARATA

3.1.1. Fiksacija

Kemijska fiksacija je postupak koji se provodi zbog očuvanja fizičkog ustroja i molekularnog sastava tkiva. Izrezani ciljani dijelovi biljke uronjeni su u fiksativ. Fiksativ je otopina tvari koje stabiliziraju tkivne bjelančevine. Za potrebe ovog istraživanja kao fiksativ je korištena otopina 4%-tni paraformaldehida u fosfatnom puferu pH 6,8. Prilikom fiksiranja uzoraka pazilo se da volumen korištenog fiksativa bude 15 – 20 puta veći od volumena tkiva, a vrijeme trajanja fiksacije je jedan dan. Nakon provedene fiksacije, tkivo se kratko ispralo od zaostalih nečistoća u destiliranoj vodi.

3.1.2. Dehidracija

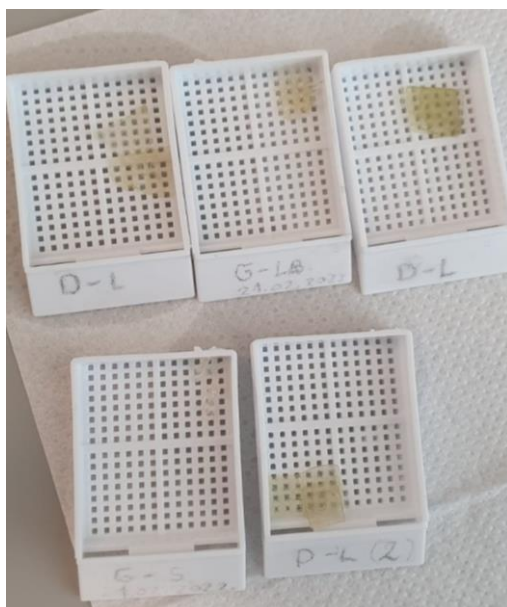
Postupak dehidracije omogućuje da iz fiksiranih i ispranih dijelova tkiva ukloni voda. Uklanjanje vode provodi se uzastopnim prenošenjem izrezanih dijelova tkiva kroz mješavinu alkohola i vode kojoj se postepeno povećava koncentracija. Prijenos tkiva iz nižih u više koncentracije omogućava postupnu prilagodbu promjenama i smanjuje moguća oštećenja osjetljive strukture tkiva. Tkivo se u određenim vremenskim intervalima prenosilo kroz seriju etilnog alkohola (Tablica 4).

Tablica 4. Postupak dehidracije tkiva

| Koncentracija etanola (%) | Vrijeme (min) |
|---------------------------|---------------|
| 50 | 45 |
| 75 | 45 |
| 95 | 45 |
| 95 | 60 |
| 100 | 60 |
| 100 | Preko noći |

3.1.3. Natapanje

Uklapanje tkiva u čvrsto sredstvo omogućuje rezanje istog na vrlo male dimenzije. Kao sredstvo za uklapanje najčešće se koristi parafin (Paraplast Plus, Leica). Parafin nije topljiv u alkoholu. Alkohol zaostao u tkivu nakon dehidracije potrebno je istisnuti nekim drugim sredstvom i pripremiti tkivo za prožimanje parafinom. Taj postupak kod izrade histoloških rezova zove se natapanje ili prosvjetljavanje. Ksilena koji se koristio u ovom postupku ima dvije uloge. Prva je da ukloni ostatak alkohola iz tkiva i omogući prožimanje tkiva parafinom, a druga da tkivo učini staklastim i prozirnim, tj. spremnim za histološko bojanje. Ovaj postupak provodi se u digestoru zbog para ksilena koje mogu nadražiti dišni sustav i oči. Tkivo se prvo tri puta po 15 minuta ispire u ksilenu, a potom je spremno za idući korak u procesu izrade histoloških rezova.



Slika 27. Obezbojena tkiva nakon ispiranja u ksilenu (Histološki laboratorij, vlastita fotografija, 2022)

3.1.4. Prožimanje tkiva i izrada parafinskih blokova

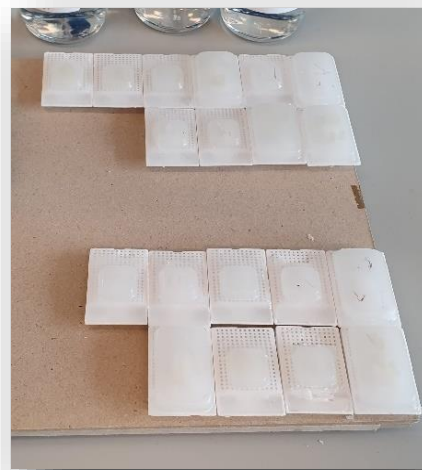
Idući korak izvodi se u termostatu gdje se tkivo stavlja u otopljeni parafin (Paraplast Plus, Leica). Parafin se priprema miješanjem tvrdog i mekog parafina uz dodatak bijelog pčelinjeg voska u granulama. Temperatura taljenja tako pripremljenog parafina je 58 – 60 °C pa je iznimno važno namjestiti termostat na tu temperaturu i održavati je stalnom. Oscilacije u

temperaturi mogu dovesti do skrućivanja parafina i oštećenja tkiva. Uzorci tkiva se prenose pincetom kroz tri parafinske kupelji u termostatu na temperaturi od 58 °C, a boravak tkiva u svakoj kupelji je jedan sat. Pod utjecajem temperature ksilen isparava i svi prostori u tkivu ispunjavaju se parafinom.

Nakon prožimanja tkiva parafinom potrebno je u što kraćem roku izraditi parafinske blokove jer se pri sobnoj temperaturi stvaraju parafinski kristali koji mogu oštetiti tkivo. Za izradu parafinskih blokova koristio se aparat HistoCore Arcadia H (Leica, Njemačka). Aparat se sastoji od kupelji za otapanje parafina te tople i hladne ploče koje pomažu u modeliranju parafina tijekom procesa uklapanja. Početni korak je dno metalne kadice za uklapanje (dimenzije 1 x 1 x 1cm) preliteri tekućim parafinom, a potom u njega položiti uzorak tkiva. Tkivo se položilo u istoj u okomit i vodoravan položaj kako bi na jednom rezu dobila uzdužni i poprečni prerez kroz tkivo. Tkivo je potrebno pridržavati pincetom dok se parafin polustvrdnuo kako bi tkivo ostalo nepomično stajati, a potom u kadicu postaviti plastični disk s oznakom naziva tkiva i dopuniti s tekućim parafinom. Izrađeni parafinski blokovi su se ostavili u hladnjaku preko noći. Idući dan nakon vađena iz kalupa parafinski blokovi su bili spremni za rezanje.



Slika 28.



Slika 29.

Slika 28. HistoCore Arcadia H (Katalog znanstveno – istraživačke opreme PMF-ST)

Slika 29. Uzorci biljnog tkiva uklopljeni u parafin na plastičnim diskovima (Histološki laboratorij, vlastit izvor, 2022)

3.1.5. Rezanje parafinskih blokova

Za rezanje tkiva uklopljenog u parafinske blokove korišten je rotacijski mikrotom HistoCore BIOCUT (Leica, Njemačka). Prvo se parafinski blok učvrstio na držač nakon čega se namjestila željena debljina reza (4 – 6 μm). Svakim okretanjem pogonskog kotača držač s parafinskim blokom pomaknuo se za 4 – 6 μm unaprijed. Rotiranjem klizne ručke držač s parafinskim blokom je prelazio preko oštrice žileta i pravio jednake rezove debljine 4 – 6 μm . Kada se stvorila linija od 3 – 4 reza pomoću navlaženog kista su se prebacili u toplu vodenu kupelj temperature do 40 °C. Nakon što su se rezovi izravnali na površini vode, prebacili su se na predmetna stakalca prethodno očišćena etanolom na način da su se stakalca uronila u vodenu kupelj i njihovim podizanjem podignemo i rezove s površine vode. Izrađeni preparati su se ostavili preko noći da se suše na zraku.



Slika 30.



Slika 31.

Slika 30. Rotacijski mikrotom HistoCore BIOCUT (Katalog znanstveno – istraživačke opreme PMF-ST)

Slika 31. Peglanje parafinskih rezova u vodenoj kupelji (Rolls, G. (2008): 101 Steps to Better Histology. Leica microsystems)

3.1.6. Deparafiniranje tkiva

Deparafiniranje tkiva je postupak uklanjanja parafina iz tkiva uz pomoć ksilena. Deparafiniranje se uvijek provodilo neposredno prije bojanja rezova i prilikom pripreme preparata za imunofluorescenciju.

3.1.7. Bojanje tkiva

Tkiva su zbog prethodno provedenih koraka bezbojna stoga zbog lakšeg promatranja i pretraživanja moraju se obojati. Razvijene su razne metode bojanja tkiva, a u ovome radu preparati su obojeni imunohistokemijskim bojanjem s diaminbenzidinom (DAB).

3.1.7.1. Imunohistokemijsko bojanje rezova s diaminbenzidinom

U ovom radu upotrijebljeno je biljno tkivo koje je fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafin. Nakon otkrivanja antigena tretirano je primarnim antitijelom specifičnim za proteinski antigen; TGG1 mirozinaza 1 (Tablica 5), zečje primarno antitijelo razrijeđeno 1:1000 u PBS-u. Otopina određenog razrjeđenja primarnog antitijela dodana je na tkivni prerez te je inkubacija trajala tijekom noći, tj. tijekom vremena potrebnog da dođe do maksimalnog vezanja molekula antigena i primarnog antitijela. Nakon ovog koraka isprana su nevezana antitijela i dodana je BIOTINILIRANA LINK otopina (*biotinilirani anti-rabbit i anti-mouse imunoglobulini*) (Tablica 6) koja sprječava križno vezanje serumskih proteina. Potom je dodana otopina streptavidin-HRP (Tablica 6) tj. streptavidin povezan s peroksidazom hrena (HRP, od engleskog horseradish peroxidase). Nanesena je na uzorak te se tijekom iduće inkubacije streptavidin vezao na LINK koji se vezao na primarno protutijelo. Nakon inkubacije streptavidinom uzorak se ponovno isprao da se uklone nevezana antitijela. Vizualizacija je učinjena 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) (Tablica 7). Enzim HRP pretvorio je supstrat DAB-a u smeđi precipitat koji se stvara u tkivu na mjestu reakcije te tako vizualizira mjesto vezanja primarnoga specifičnog antitijela i ciljanog antigena.

Neposredno prije bojanja diaminbenzidinom histološki preparati su postavljeni u nosač i provedeni kroz seriju ksilena i seriju etanola te su se isprali u destiliranoj vodi (Tablica 8).

Tablica 5. Prikaz primarnog protutijela

| Naziv | Kod | Domaćin | Razrijeđenje | Proizvođač |
|--------------------|-------|---------|--------------|---|
| TGG1 Mirosinase 1 | BGL38 | zec | 1:1000 | Agrisera Part of Olink Group, Vannas, Sweden |

Tablica 6. Prikaz Dako LSAB®2 System-HRP

| Naziv | Kod | Domaćin | Proizvođač |
|------------------------|-------|---------|--|
| Dako LSAB®2 System-HRP | K0609 | hren | Dako North America, Inc., California, USA |

Tablica 7. Prikaz DAB supstrata

| Naziv | Kod | Proizvođač |
|----------------------|--------|--|
| DAB substrate system | ZY0643 | Dako North America, Inc., California, USA |

Tablica 8. Postupak pripreme preparata

| Deparafiniranje u ksilenu | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Ksilen I | 5 minuta |
| Ksilen II | 5 minuta |
| Ksilen III | 5 minuta |
| Rehidracija u etanolu | |
| 100% etanol | 10 minuta |
| 100% etanol | 10 minuta |
| 95% etanol | 5 minuta |
| 70% etanol | 5 minuta |
| Destilirana voda (dH ₂ O) | 1 minuta (uz miješanje) |

Nakon što su se tkiva pripremila, proveden je postupak bojenja diaminbenzidinom prema prikazu u Tablici 9.

Tablica 9. Postupak bojenja diaminbenzidinom

| | |
|--|--------------------------------|
| 1% vodikov peroksid (H ₂ O ₂) | 10 minuta |
| Destilirana voda (dH ₂ O) | 3 x 1 minuta |
| Citratni pufer (pH = 6.0) | 8 – 10 minuta u kuhalu na paru |
| Ohladiti na sobnu temperaturu | 20 minuta |
| Fosfatni pufer – PBS (pH = 7.2) | 3 x 2 minute |
| Ocijedit preparate na papiru i obrisati stražnju stranu | |

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| PAP pen | Okružiti rezove |
| Protein blok otopina | 20 minuta |
| Primarno protutijelo (Ab) | Inkubacija preko noći |
| Fosfatni pufer – PBS (pH = 7.2) | 3 x 2 minute |
| LINK otopina | 15 minuta |
| Fosfatni pufer – PBS (pH = 7.2) | 3 x 2 minute |
| STREPTAVIDIN - HRP | 15 minuta |
| Fosfatni pufer – PBS (pH = 7.2) | 3 x 2 minute |
| DAB supstrat sistem | 5 – 10 minuta |
| Destilirana voda (dH ₂ O) | Kada počne smeđiti |
| Hematoksilin | 1 minuta |
| Topla obična voda | Isprati u kadici |
| Destilirana voda (dH ₂ O) | 2 minute pa posušiti |
| 75% etanol | 2 minute |
| 95% etanol | 2 minute |
| 100% etanol | 2 minute |
| Ksilen III | 5 minuta |
| Ksilen IV | 5 minuta |

- PAP pen (hidrofobni flomaster) → Nanosi se u obliku punog kruga oko tkiva kako bi sprječio razlijevanje protutijela s tkiva.
- Protein blok → Sprječava nespecifično vezanje primarnog protutijela i osigurava kvalitetnije signale koji daju rezultat bez pojave šuma.
- Hematoksilin → Bazična boja koja plavo-ljubičasto oboji bazofilne sastojke tkiva (jezgra, dijelovi citoplazme s mnogo RNA, međustanična tvar hijaline hrskavice)

3.1.8. Utrajnjivanje tkiva

Obojene preparate potrebno je pripremiti za mikroskopiranje. Nakon što je završio proces bojenja, preparati su pažljivo obrisani. Na svako staklo nakapano je nekoliko kapi NeoMount otopine za utrjivanje preparata. Pod kutom od 45° položeno je pokrovno stakalce. Tako pripremljena stakalca ostavljena su da se osuše na 15 minuta nakon čega su bila spremna za mikroskopiranje.

3.1.9. Mikroskopiranje

Izrađeni preparati promatrani su pomoću svjetlosnog mikroskopa Leica DM3000 LED (Leica, Njemačka) i snimljeni kamerom Leica DMC4500 na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

3.2. IMUNOFLUORESCENCIJA (IF)

Tehnika neizravne imunofluorescencije korištena je za prepoznavanje i lokalizaciju specifičnog enzima mirozinaze u tkivima vegetativnih biljnih organa korijena, stabljike i lista biljke dragoljuba (*Tropaeolum majus* L.). U ovom radu korišteno je primarno protutijelo TGG1 mirozinaza 1 (Tablica 10), zečje primarno antitijelo razrijeđeno 1:1000 u PBS-u i sekundarno protutijelo Alexa Fluor 488 anti-zečje IgG sekundarno protutijelo (Tablica 11), razrijeđeno 1:400 u PBS-u.

Tablica 10. Prikaz primarnog protutijela

| Naziv | Kod | Domaćin | Razrijeđenje | Proizvođač |
|--------------------|-------|---------|--------------|--|
| TGG1 Mirosinase 1 | BGL38 | zec | 1:1000 | Agrisera Part of Olink Group, Vannas, Sweden |

Tablica 11. Prikaz sekundarnog protutijela

| Naziv | Kod | Domaćin | Razrijeđenje | Proizvođač |
|---|-------------|---------|--------------|--|
| Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) | 711-545-152 | magarac | 1:400 | Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, USA |

Prije početka bojenja za imunofluorescenciju preparati su prošli postupak deparafiniranja i rehidracije prikazane u Tablici 12.

Tablica 12. Postupak pripreme preparata za bojenje

| Deparafiniranje | |
|--------------------------------------|-----------|
| Ksilen I | 5 minuta |
| Ksilen II | 5 minuta |
| Ksilen III | 5 minuta |
| Rehidracija | |
| 100% Etanol | 10 minuta |
| 100% Etanol | 10 minuta |
| 95% Etanol | 5 minuta |
| 70% Etanol | 5 minuta |
| Destilirana voda (dH ₂ O) | 5 minuta |

Potom je provedena neizravna imunofluorescencija prema sljedećem protokolu:

1. 1M citratni pufer (pH=6.0) → preparate kuhati u kuhalu na paru (na hladno) 10 minuta, a nakon toga se kupelj s preparatima hladi do sobne temperature 20 minuta. Ovaj postupak uz pomoć topline otkriva epitope na antigenu za koje će se vezati primarno protutijelo.
2. 4 x 10 minuta PBS pufer (pH=7.2) → ispiranje preparata.
3. Uzorke izvaditi iz kadice i poredati u vlažnu komoricu u koju treba dodati destilirane vode dovoljno da prekrije dno.
4. Pažljivo prebrisati predmetna stakalca pazeći da se ne dodiraju uzorci tkiva.
5. PAP pen (hidrofobni flomaster) → napraviti otisak punog kruga oko tkiva i pustiti 2 minute da se otisak osuši. Sprječava razlijevanje protutijela s tkiva.
6. Protein blok – kapaljkom nakapati na svaki uzorak i pustiti da djeluje 30 minuta. Sprječava nespecifično vezanje primarnog protutijela i osigurava kvalitetnije signale koji daju rezultat bez pojave šuma.
7. Stresti protein blok u sudoper, a stakalca vratiti u vlažnu komoricu.
8. Primarno protutijelo – mikropipetom na svaki uzorak tkiva dodati 70 µL primarnog protutijela razrijeđenog s PBS puferom. Negativnu kontrolu prekriti s jednakom količinom PBS pufera, ali bez primarnog protutijela.
9. Tako pripremljene uzorke u vlažnoj komorici poklopiti kako bi osigurali uvjete bez svjetla i ostaviti preko noći.
10. 2 x 5 minuta PBS pufer (pH=7.2) → ispiranje preparata u nosaču s drškom.
11. Poredati prebrisane preparate u vlažnu komoricu.

12. Sekundarno protutijelo - mikropipetom na svaki uzorak tkiva dodati 70 μ L sekundarnog protutijela razrijeđenog PBS puferom. Negativnu kontrolu prekriti s jednakom količinom PBS pufera, ali bez sekundarnog protutijela.
13. Poklopiti komoricu i ostaviti 1 sat.
14. 2 x 5 minuta PBS pufer (pH=7.2) → ispiranje preparata u nosaču s drškom.
15. Poredati prebrisane preparate u vlažnu komoricu.
16. DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) → uz pomoć bočice s kapalicom dokapati na svaki uzorak i ostaviti da djeluje 1 minutu. Omogućuje bojanje jezgara na preparatu. Neiskorišteni dio DAPI otopine potrebno je sanirati u kadicu s varikinom umjesto prolijevanja u sudoper jer DAPI ima kancerogeno djelovanje. Na taj način se sprječava otpuštanje štetnih tvari u okoliš.
17. 2 x 5 minuta PBS pufer (pH=7.2) → ispiranje preparata u nosaču s drškom.
18. Nakon ispiranja s preparata obrisati višak pufera i pustiti 2 minute da se osuše.
19. Aqua/Poly Mount – nakapati nekoliko kapi na predmetno stakalce i prekriti pokrovnim stakalcem. Sušiti 10 minuta na zraku.

Izrađeni preparati promatrani su epifluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 (Tokyo, Japan) u prostorima KBC Firule, Split. Fotografije su fotografirane digitalnim fotoaparatom Nikon DS-Ri1 (Nikon Corporation, Tokio, Japan).

4. REZULTATI

4.1. MJERENJE TKIVA PRIJE UKLAPANJA

Za izradu ovog rada korištena je biljka dragoljub samostalno uzgojena iz sjemena u kontroliranim laboratorijskim uvjetima (Slika 32, 33 A, 34; A i B; 35 B, 36; A i B). Prilikom svakog uzorkovanja korišteno je pet biljaka koje su iz zemlje vađene tako da u jednom komadu imaju očuvane korijen, stabljika i list (Slika 33 B, 34 C, 35 A, 36 C). Mjerena je duljina svakog dijela biljke zasebno, a potom ukupna duljina cijele biljke. Na posljertku je dobivena prosječna duljina svih dijelova biljke i ukupna prosječna duljina cijele biljke. Iz ovih mjerenja može se zaključiti da je u prvom tjednu rasta biljka dosegla prosječnu duljinu od 25,7 cm od čega je najveći dio biljke zauzimala stabljika prosječne duljine 18,34 cm. Korijen je u ovom periodu bio slab i nerazvijen s prosječnom duljinom od 5,56 cm, a promjer listova nije prelazio 2,5 cm. Prosjek promjera lista bio je 1,8 cm (Tablica 13).

U drugom tjednu uzorkovanja ukupna duljina biljke nije se značajno promijenila, pa je stabljika otprilike iste duljine kao i u prvom tjednu, međutim značajne promjene mogu se opaziti u razvoju korijena. Korijen je u ovom periodu narastao u prosjeku 4 cm, tj. s prosječne vrijednosti 5,56 cm na 9,34 cm. Listovi su i dalje mali, u prosjeku 2,42 cm, najveći od njih dostigao je promjer od 3,1 cm (Tablica 14).

U ostala dva tjedna biljka ravnomjerno napreduje u rastu. U trećem tjednu prosječna duljina biljke je 33,24 cm (Tablica 15), dok u četvrtom tjednu dostiže prosječnu veličinu od 36,58 cm (Tablica 16). Stabljika kao i do sada ima uglavnom zanemarive oscilacije, a kod korijena i lista uočen je trend laganog rasta.

U trećem tjednu su uočene oscilacije u obliku lista. Veći (stariji) listovi poprimili su nazubljeni oblik, dok je dio manjih (mlađih) listova bio okruglog oblika (Slika 35 C). U četvrtom tjednu zamijećeno je da je dio stabljika starenjem poprimio smeđu boju, dok je većina ostala zelena (36 C).



Slika 32. Klica dragoljuba

1. Tjedan (21.02.2022.)

Tablica 13. Rezultati mjerenja uzorak za prvi tjedan uzorkovanja

| Duljina [cm] | Korijen | Stabljika | List | Ukupno |
|-----------------------------|---------|-----------|------|--------|
| Uzorak | | | | |
| Biljka 1 | 5,9 | 15,2 | 1,4 | 22,5 |
| Biljka 2 | 3,9 | 19,5 | 2,3 | 25,7 |
| Biljka 3 | 4,4 | 16,8 | 1,6 | 22,8 |
| Biljka 4 | 6,2 | 21,4 | 2,1 | 29,7 |
| Biljka 5 | 7,4 | 18,8 | 1,6 | 27,8 |
| Prosječna vrijednost | 5,56 | 18,34 | 1,8 | 25,7 |

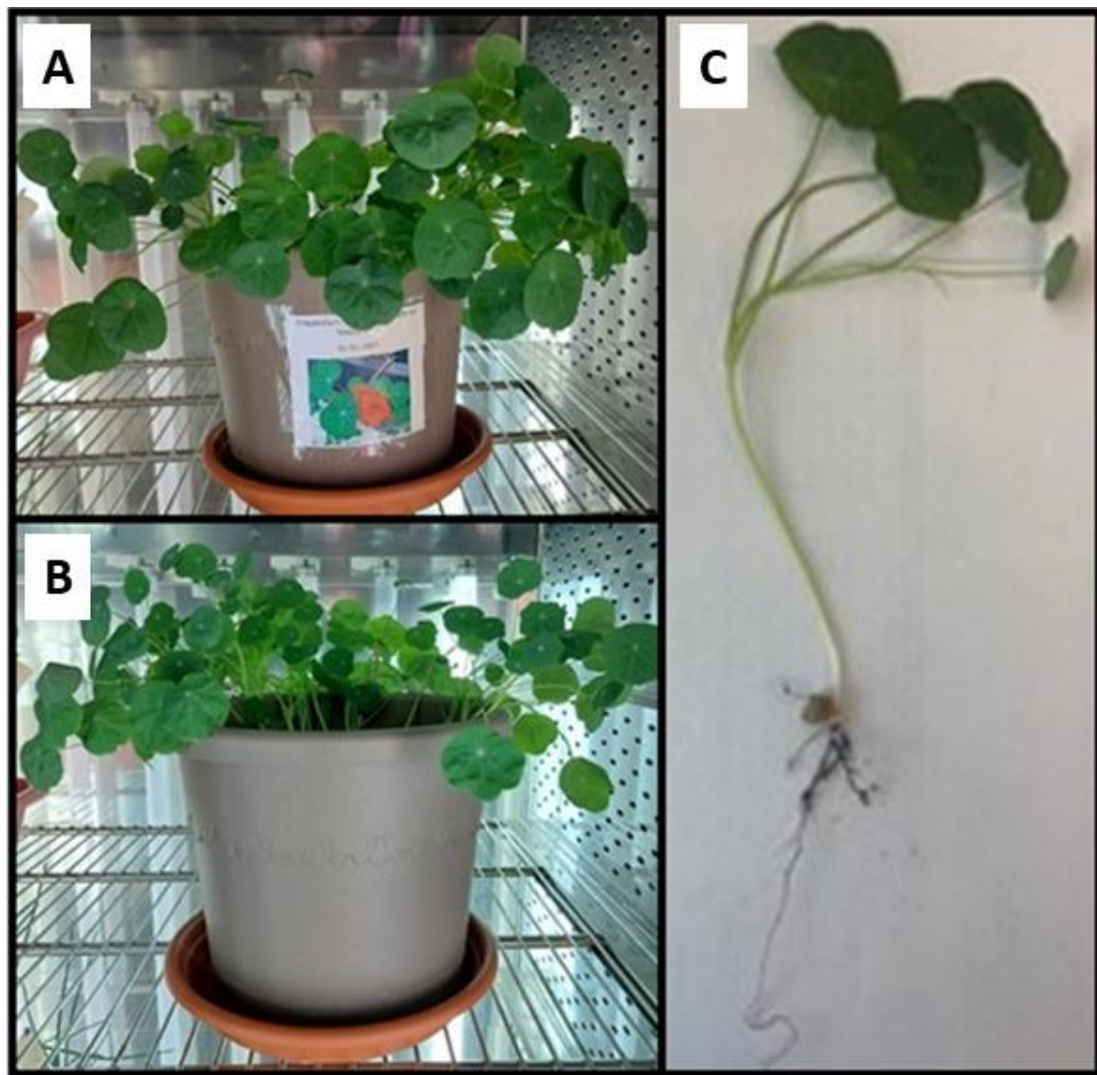


Slika 33. *Tropaeolum majus* L.; A: biljka stara 19 dana; B: uzorak koji je mjereno u prvoj fazi istraživanja

2. Tjedan (28.02.2022.)

Tablica 14. Rezultati mjerenja uzorak za drugi tjedan uzorkovanja

| Duljina [cm] | Korijen | Stabljika | List | Ukupno |
|-----------------------------|---------|-----------|------|--------|
| Uzorak | | | | |
| Biljka 1 | 10,2 | 21,4 | 1,9 | 33,5 |
| Biljka 2 | 10,4 | 19,9 | 2,6 | 22,5 |
| Biljka 3 | 12,4 | 19,1 | 2,8 | 21,9 |
| Biljka 4 | 6,8 | 19,1 | 3,1 | 22,2 |
| Biljka 5 | 6,9 | 21,9 | 1,7 | 23,6 |
| Prosječna vrijednost | 9,34 | 20,28 | 2,42 | 24,74 |

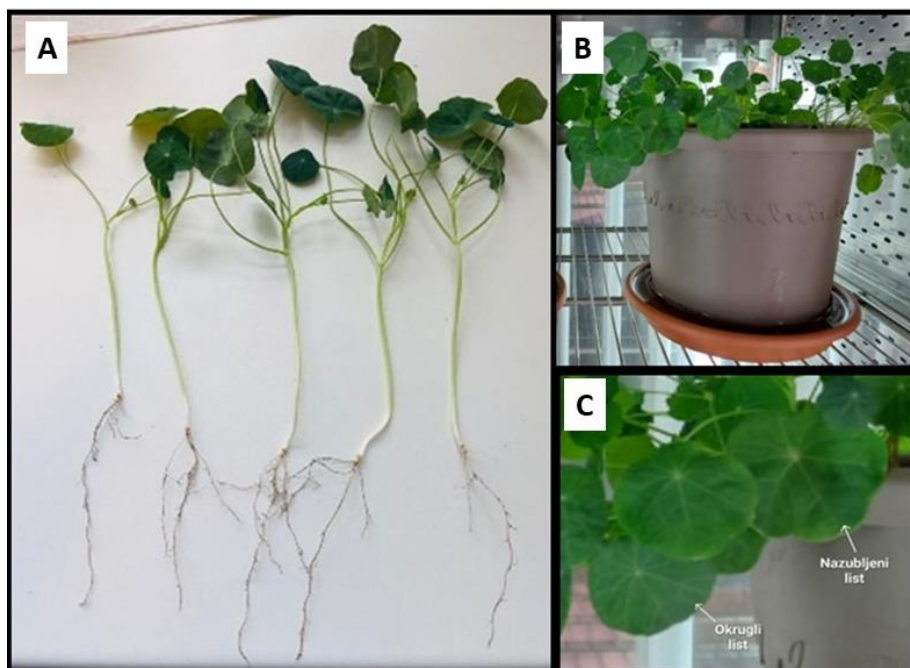


Slika 34. *Tropaeolum majus* L.; A i B: biljka stara 26 dana; C: uzorak koji je mjereno u drugoj fazi

3. Tjedan (07.03.2022.)

Tablica 15. Rezultati mjerenja uzorak za treći tjedan uzorkovanja

| Duljina [cm] | Korijen | Stabljika | List | Ukupno |
|-----------------------------|---------|-----------|------|--------|
| Uzorak | | | | |
| Biljka 1 | 9,8 | 21,1 | 1,8 | 32,7 |
| Biljka 2 | 9,9 | 22,3 | 2,3 | 34,5 |
| Biljka 3 | 10,6 | 22,4 | 2,3 | 35,3 |
| Biljka 4 | 9,8 | 22,1 | 2,1 | 34,0 |
| Biljka 5 | 10,9 | 16,8 | 2,0 | 29,7 |
| Prosječna vrijednost | 10,2 | 20,94 | 2,1 | 33,24 |

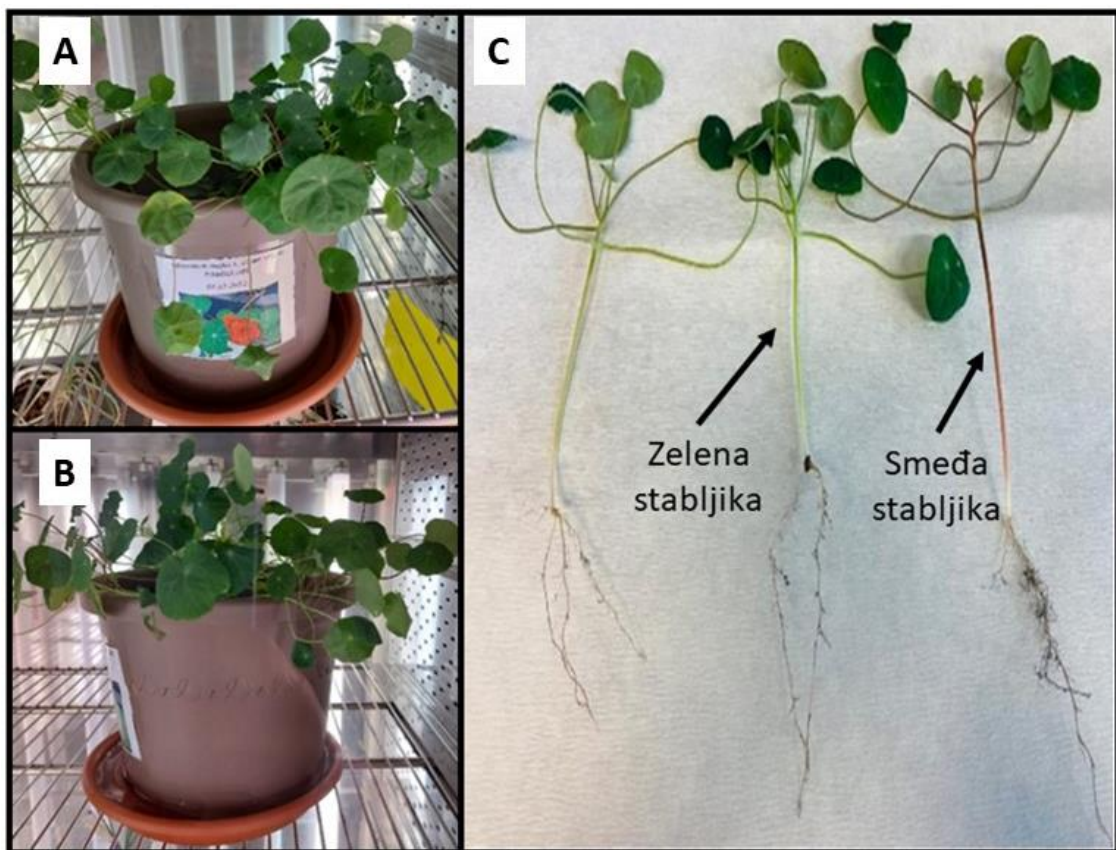


Slika 35. *Tropaeolum majus* L.; A: uzorci koje smo mjerili u trećoj fazi istraživanja; B: biljka stara 33 dana; C: morfološka razlika na listu koju smo uočili u trećem tjednu uzorkovanja, stariji listovi poprimili su nazubljeni oblik, dok su mlađi listovi imali okrugli oblik

4. Tjedan (14.03.2022.)

Tablica 16. Rezultati mjerenja uzorak za četvrti tjedan uzorkovanja

| Duljina [cm] | Korijen | Stabljika | List | Ukupno |
|-----------------------------|---------|-----------|------|--------|
| Uzorak | | | | |
| Biljka 1 | 9,6 | 19,1 | 3,1 | 31,8 |
| Biljka 2 | 10,9 | 21,9 | 3,2 | 36,0 |
| Biljka 3 | 8,7 | 17,6 | 3,1 | 46,1 |
| Biljka 4 | 11,2 | 19,5 | 3,6 | 34,3 |
| Biljka 5 | 7,8 | 23,2 | 3,7 | 34,7 |
| Prosječna vrijednost | 9,64 | 20,26 | 3,34 | 36,58 |



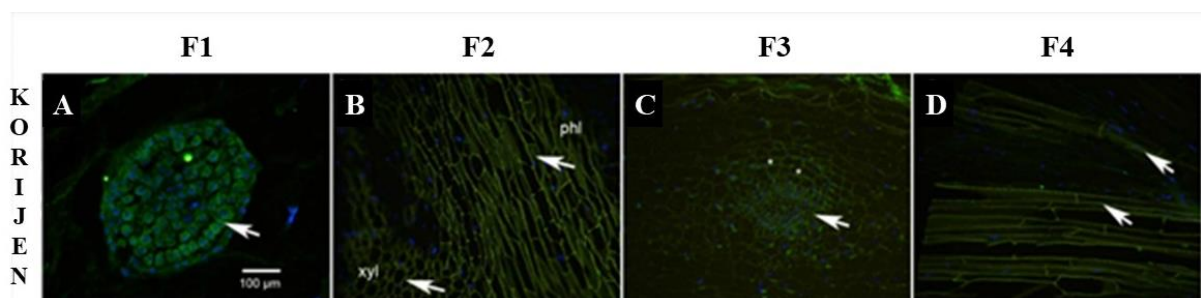
Slika 36. *Tropaeolum majus* L.; a i b: biljka stara 40 dana; c: uzorci koje smo mjerili u četvrtoj fazi istraživanja; morfološka razlika na stabljici koju smo uočili u četvrtom tjednu uzorkovanja, mali dio stabljika poprimio je smeđu boju, dok je većina stabljika i dalje standardno svijetlo zelena

4.2. EKSPRESIJA ENZIMA DOBIVENA IMUNOFLORESCENCIJOM

Enzim mirozinaza pronađen je u svim istraživanim biljnim organima *Tropaeolum majus* L., u korijenu, stabljici i listu. Mirozinaza je unutar tkiva locirana unutar posebne vrste stanica, idioblastima, koji se nazivaju mirozinske stanice (Slika 37 A). Idioblasti su specijalizirane stanice raspršene na niskoj frekvenciji i često kao pojedinačne stanice među drugim glavnim stanicama u tkivu. Stanice mirozinaze su anatomske karakterizirane visokim sadržajem proteina u vakuoli i stoga su sklone citokemijskim reakcijama s određenim proteinskim reagensima. Pozitivni imunofluorescencijski signal na protutijelo mirozinaze tip 1 pojavio se u osnovnom i provodnom tkivu u svim istraživanim dijelovima biljke.

4.2.1. Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u korijenu biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) kroz četiri različite faze rasta biljke

Slika 37 prikazuje rezultate imunofluorescentnog bojanja korijena pregledane na fluorescentnom mikroskopu. U korijenu je izraziti pozitivitet za enzim mirozinazu uočen u idioblastima osnovnog tkiva parenhima koji se zovu mirozinske stanice (Slika 37 A). Ako prikazanu sliku usporedimo sa statističkim podacima (Slika 40) može se zaključiti da je najjači imunofluorescencijski signal mirozinaze tipa 1 u području korijena posebno izražen u fazi 1 i fazi 2 razvoja biljke nakon klijanja, tj. u periodu od 20 – 30 dana nakon sijanja biljke. Također može se uočiti da se umjereni pozitivan signal za mirozinazu tipa 1 javlja i u stanicama parenhima ksilema (Slika 37; B i C) te u stanicama floema (Slika 37; B i D).

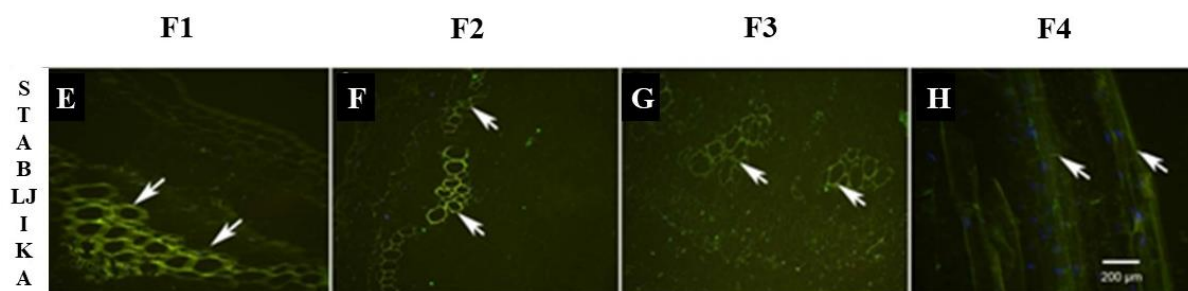


Slika 37. (A-D) Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u mladim parenhimskim stanicama korijena dragoljuba (*Tropaeolum majus* L.) u četiri različite razvojne faze (F1-F4). Lokalizacija mirozinaze tipa 1 u mladim matičnim stanicama parenhima (Slika A) i u stanicama provodnog

tkiva korijena (Slika B-D). Xyl – ksilem; phl – floem; * - stanica mirozinaze. (Povećanje 40x u b-d)

4.2.2. Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u stabljici biljke dragoljub (*Tropaeolum majus*) kroz četiri različite faze rasta biljke

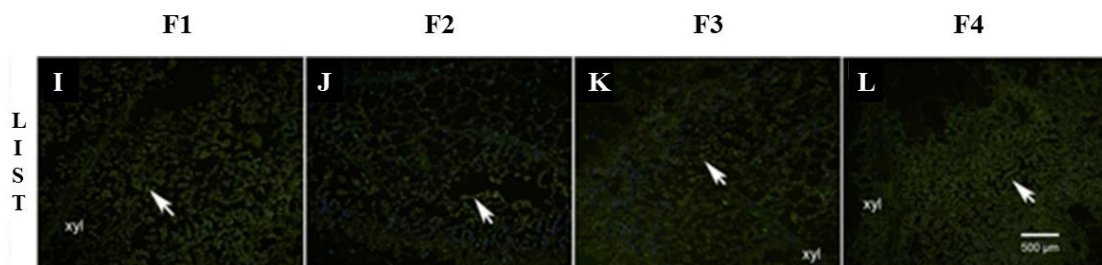
Slika 38 prikazuje rezultate imunofluorescentnog bojanja stabljike pregledane na fluorescentnom mikroskopu. Tijekom sve četiri ispitivane faze pronađena je pozitivna ekspresija u području provodnog tkiva. Slika 38 (E-G) predstavlja velike ksilemske žile s praznim lumenima, dok na slici 38 (H) možemo uočiti stanice stijenke floema. Ako se prikazana slika uspoređi sa statističkim podacima (Slika 40) može se zaključiti da je izražaj najjačeg intenziteta enzima mirozinaze tipa 1 u području stabljike prisutan u fazi 2 i fazi 3 razvoja biljke nakon klijanja, tj. u periodu od 25 – 30 dana nakon sijanja biljke, s znatno većom ekspresijom u drugoj fazi. Također možemo primijetiti da starenjem biljke razina imunoekspresije pada, pa već u četvrtoj fazi tj. 40 dana nakon sijanja imunofluorescencijski signal znatno slabi.



Slika 38. Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u mladim vaskularnim stanicama stabljike (E-H) dragoljuba (*Tropaeolum majus* L.) u četiri različite razvojne faze (F1-F4). xyl- ksilem; phl – floem; * - stanica mirozinaze. (Povećanje 20x u e-h).

4.2.3. Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u listu biljke dragoljub (*Tropaeolum majus*) kroz četiri različite faze rasta biljke

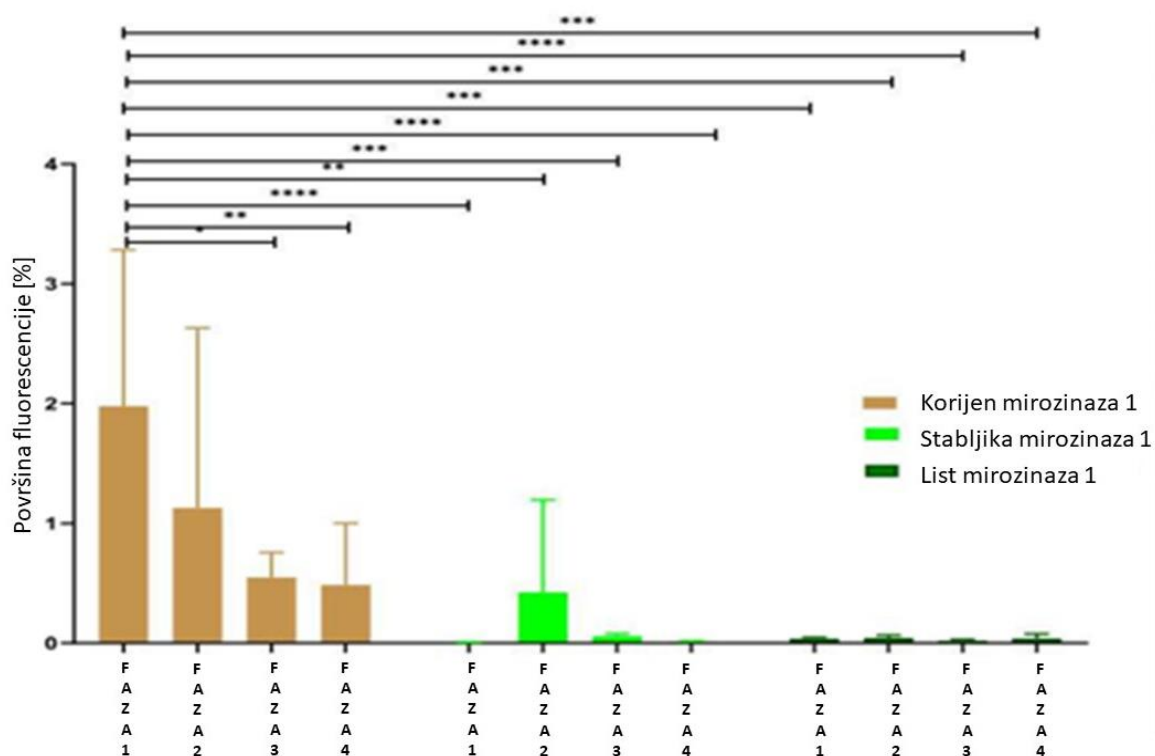
Slika 39 prikazuje rezultate imunofluorescentnog bojanja lista pregledane na fluorescentnom mikroskopu. Imunoekspresija enzima mirozinaze uočena je u mladim stanicama osnovnog parenhimskog tkiva. Rezultati se odnose na područje ksilema s izraženim prstenastim zadebljanjem provodnih elemenata (Slika 39; I-L). Ako se prikazana slika uspoređi sa statističkim podacima (Slika 40) može se zaključiti da nema značajnijeg imunofluorescencijskog signala enzima mirozinaze tipa I kroz sve četiri razvojne faze u regiji lista.



Slika 39. Ekspresija enzima mirozinaze tipa 1 u mladim stanicama temeljnog tkiva u žilnom dijelu lista (I-L) dragoljuba (*Tropaeolum majus* L.) u četiri različite razvojne faze (F1-F4). xyl-ksilem; phl – floem; * - stanica mirozinaze. (Povećanje 10x u i – l).

4.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA DOBIVENA ANOVA ANALIZOM I PROVEDBOM TURKYJEVOG TESTA VIŠESTRUKKE USPOREDBE

Za statističku obradu podataka korišten je dvosmjerni ANOVA test nakon čega je Tukeyjevim testom višestruke usporedbe ispitana razlika u imunoekspresiji enzima mirozinaze tipa 1 između područja korijena, stabljike i lista u četiri razvojne faze. Radi se o testu koji uspoređuje razliku u srednjoj vrijednosti svakog mogućeg para rezultata s odgovarajućim prilagodbama za višestruko testiranje. Ova metoda testira svaki mogući par cijele grupe, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Statistička značajnost bila je razmatrana pri $p < 0,05$. Analiza rezultata je napravljena u GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, Inc., CA, SAD).



Slika 40. Ekspresija mirozinaze tipa 1 u korijenu, stabljici i listu u različitim razvojnim fazama nakon nicanja biljke. Mirozinazna ekspresija je kvantificirana mjerenjem postotka fluorescencijske površine (% površine); ** $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Enzim mirozinaza pronađen je u svim istraživanim organima biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.), u sve četiri istraživane razvojne faze nakon klijanja (Slika 40). Mirozinaza je pronađena u obliku raspršenih pojedinačnih stanica među drugim glavnim stanicama koje grade tkivo i u idioblastima koji se nazivaju mirozinske stanice. Najjača pozitivna ekspresija mirozinaze pronađena je u idioblastima osnovnog tkiva korijena.

U korijenu je pozitivna ekspresija pronađena u sve četiri istraživane razvojne faze, a ono što je zanimljivo da je u odnosu na stabljiku i list prva razvojna faza pokazala najveću razinu imunofluorescencijskog signala. Najjači pozitivni imunofluorescencijski signal mirozinaze nađen je u idioblastima osnovnog tkiva (slika 37 A) u fazi 1 i fazi 2 razvojnog razdoblja (Slika 40), tj u periodu od 20 – 30 dana nakon sisanja biljke. Rastom i starenjem biljke uočena je značajna količina gubitka imunoekspresije pa je tako u četvrtoj fazi imunofluorescencijski signal mirozinaze najslabiji. Međutim imunoekspresija u četvrtoj fazi regije korijena može se izjednačiti s onom drugom fazom regije stabljike, što je ujedno i najjača zabilježena imunoekspresija u ostalim ispitivanim dijelovima biljke.

U stabljici je pozitivna imunoekspresija u najvećoj mjeri zabilježena u drugoj i trećoj fazi istraživanja, tj. u periodu od 25 – 35 dana nakon sijanja, s izrazitom dominacijom u drugoj fazi. Najveća zastupljenost mirozinaze tipa 1 bila je u velikim žilama ksilema s praznim lumenima i stijenkama stanica floema (Slika 38; E-G). Također može se primijetiti nagli rast u imunofluorescencijskom signalu u vremenskom razdoblju od sedam dana koliko traje period između prve i druge faze testiranja. Usporedi li se imunoekspresija u stabljici s ostalim istraživanim dijelovima biljke, može se zamijetiti da je za razliku od korijena koji u prvoj fazi ima najveći imunofluorescencijski signal, kod stabljike je maksimalni doseg imunoekspresije pomaknut za sedam dana, odnosno u drugu fazu. Također iz prikazanog grafa (Slika 40) može se uočiti da je količina imunofluorescencijskog signala u fazi 4 korijena (faza s najslabijim imunofluorescencijskim signalom kod korijena) i u fazi 2 kod stabljike (faza s najjačim imunofluorescencijskim signalom kod stabljike) gotovo jednaka.

U području lista dragoljuba imunofluorescencijski signal enzima mirozinaze tipa 1 uočen je u sve četiri ispitivane razvojne faze (Slika 40), bez značajnih rezultata. Područje ksilema (s izraženim prstenastim zadebljanjem) provodnih elemenata i parenhimsko osnovno tkivo pokazuju slab signal enzima mirozinaze tipa 1 u predjelu lišća dragoljuba (Slika 39; I-L).

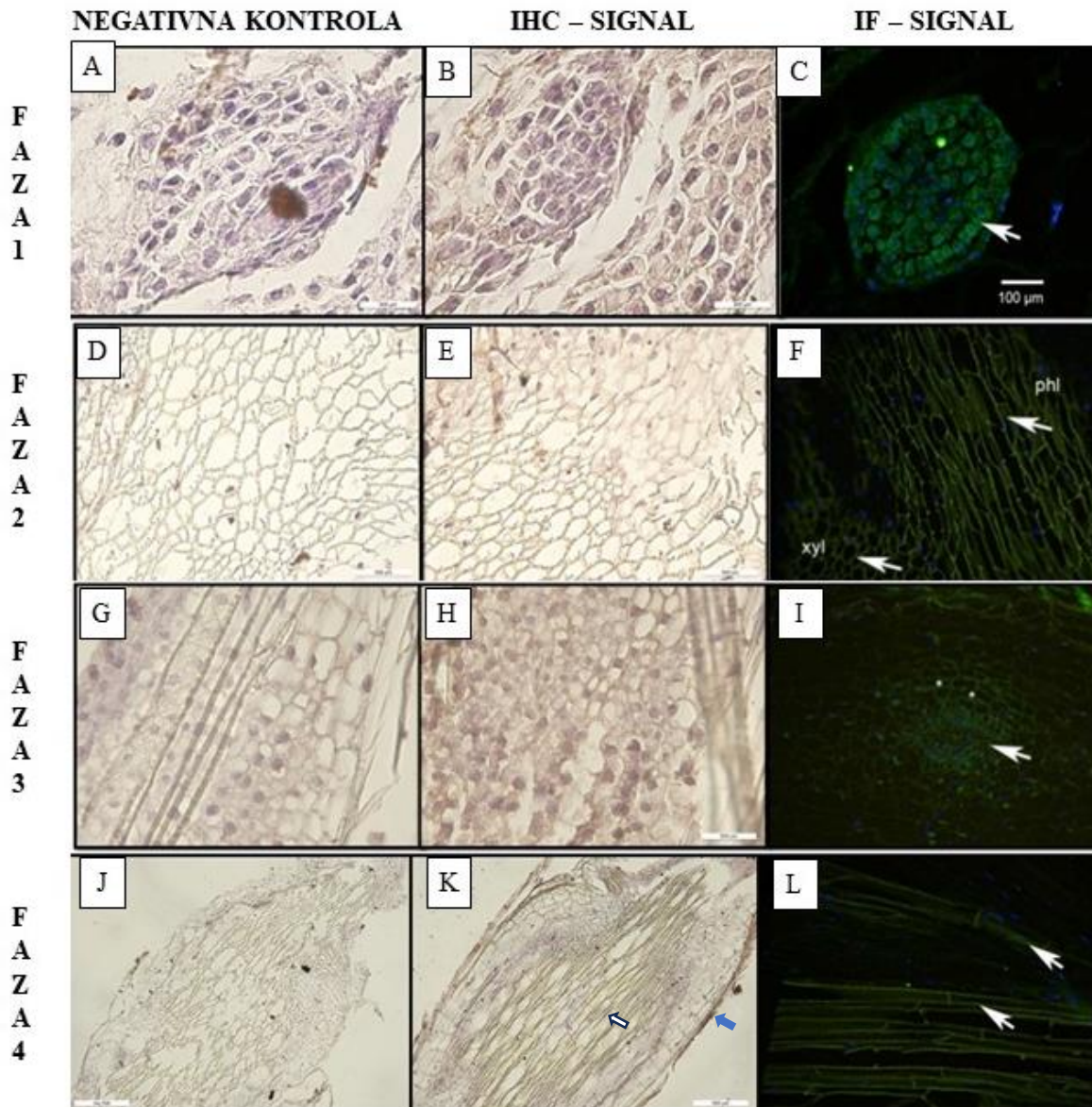
4.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA POTVRDA DOBIVENIH REZULTATA

Rezultati dobiveni primjenom metode imunofluorescencije za enzim mirozinazu su potvrđeni i bojanjem tkiva imunohistokemijskom metodom. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 41-43, od kojih svaka prikazuje redom: negativnu kontrolu, sliku dobivenu imunohistokemijskim bojanjem (IHC – signal i sliku dobivenu imunofluorescencijom (IF – signal) .

U prvoj fazi rasta korijena IHC-metodom potvrđen je rezultat u idioblastima osnovnog tkiva parenhima, koji se zovu mirozinske stanice (Slika 41; A-C). U ostale tri faze rasta korijena IF signal potvrđen je IHC metodom u stanicama parenhima ksilema (Slika 41; D-F, J-L), te u stanicama floema (Slika 41; D-F, G-I). Pozitivnim imunohistokemijskim signalom potvrđena je prisutnost enzima mirozinaze u području korteksa korijena (Slika 41 K).

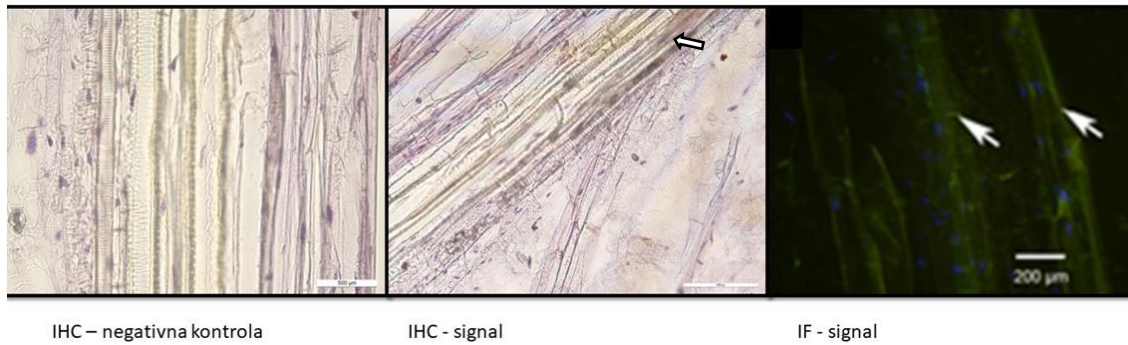
U području stabljike imunohistokemijskim bojanjem potvrđen je rezultat u području stanica stijenke floema (Slika 42; A-C).

U području lista imunohistokemijski signal je potvrđen u prvoj, drugoj i trećoj fazi u području ksilema s izraženim prstenastim zadebljanjem provodnih elemenata i parenhimskom osnovnom tkivu (Slika 43; A-I). Slika 43. E prikazuje izrazit pozitivitet imunohistokemijskog signala u području floemske lisne nervature. Također iz pozitivnog imunohistokemijskog signala možemo zaključiti da se mirozinaza nalazi uz sam rub stanice (Slika 43 H).

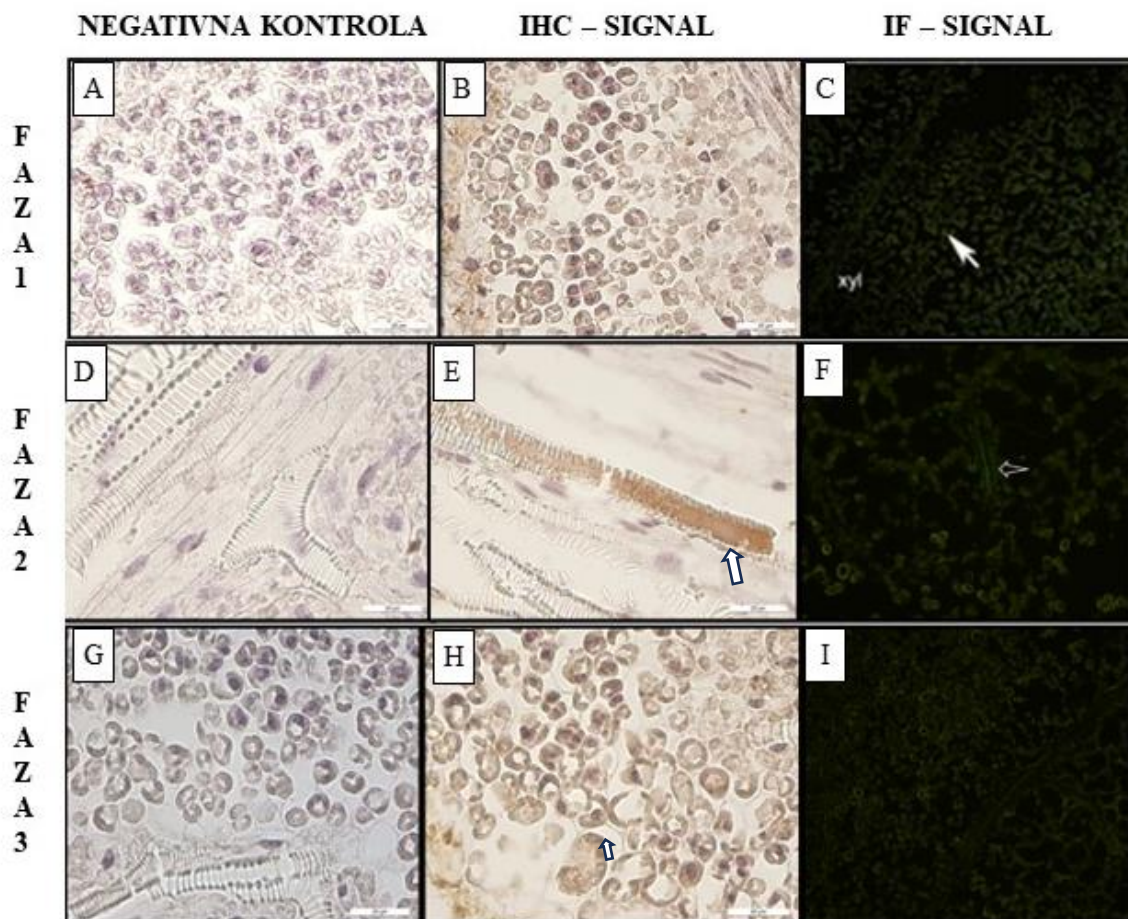


Slika 41. Usporedba rezultata u području korijena (Faza 1-4) dobivenih korištenjem dviju tehnika, imunofluorescencije i imunohistokemijskog bojenja. Lokalizacija mirozinaze tipa 1 u idioblastima osnovnog tkiva parenhima, koji se zovu mirozinske stanice (A-C), u stanicama parenhima ksilema (Slika 41; D-F, J-L), te u stanicama floema (Slika 41; D-F, G-I). Imunofluorescencijski signal (L) potvrđen na slici (K) označen je bijelom strelicom, dok plava strelica označava izrazit pozitivitet IHC signala u području korteksa korijena dragoljuba

STABLIKA FAZA 4



Slika 42. Usporedba rezultata faze 4 u području stabljike dobivenih korištenjem dviju tehnika, imunofluorescencije i imunohistokemijskog bojanja. Imunohistokemijskim bojanjem potvrđen je pozitivan signal duž cijle žile floema u području stabljike (B, bijela strelica označava rezultat)



Slika 43. Usporedba rezultata u području lista (Faza 1-3) dobivenih korištenjem dviju tehnika, imunofluorescencije i imunohistokemijskog bojanja. Ekspresija enzima mirozinaze u području ksilema s izraženim prstenastim zadebljanjem provodnih elemenata i parenhimskom osnovnom tkivu (A-I). Izrazit pozitivan IHC signal u području floemske lisne nervature (E). Pozitivan IHC signal u području ruba stanica osnovnog parenhimskog tkiva (H).

5. RASPRAVA

Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je samonikla, jednogodišnja, zeljasta biljka iz porodice dragoljupki (Tropaeolaceae) (Plantea, 2023). Sjemenke niču nakon 15-20 dana, a biljka cvate nakon 8-10 tjedana (Jakubczyk i sur., 2018). U ovom istraživanju biljka dragoljub niknula je već 10 dana nakon sijanja. Uzgajana je u termoregulatornoj komori s idealnim uvjetima izmjene dana i noći (12h/12h). Usprkos tome što je niknula za 10 dana, za vrijeme provođenja istraživanja (cca. 6 mjeseci) nije dao cvjetove. Kemijski sastav dragoljuba nije u potpunosti istražen, međutim iz dostupne literature može se zamjetiti da postoje velika odstupanja s obzirom na dio biljke koji promatramo, boju biljke, te način i mjesto uzgoja (Jakubczyk i sur., 2018).

Glukozinolati su skupina specijaliziranih metabolita karakterističnih za porodicu Brassicaceae. Mirozinaza pripada velikoj skupini β -glukozidaza i to je jedini enzim koji katalizira cijepanje S-glikozidne veze (prisutne u svim glukozinolatima) koristeći askorbat kao kofaktor i mehanizam reakcije koji zadržava anomernu konfiguraciju nakon cijepanja (Bhat i Vyas, 2019).

Mirozinaza katalizira hidrolizu tioglukozidne veze, tj. omogućava cijepanje veze između sumpora i glukoze u glukozinolatima, što dovodi do oslobađanja glukoze, sulfata i aglikona. Oslobođeni aglikon je nestabilan, te se spontano prerađuje dajući različite razgradne produkte (Zekić, 2013). Upravo je ta reakcija hidrolize, zbog kemijskih tvari koje se u njoj oslobađaju ključ mnogih benefita koje nam donosi ova još uvijek nedovoljno istražena biljka. Dragoljub se u poljoprivredi koristi kao sredstvo za zaštitu od lisnih uši, dok je u medicini pronašao svoje mjesto kao sredstvo za liječenje dišnih i mokraćnih infekcija.

Iz dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da se genetska i morfološka struktura mirozinaze mijenja kod različitih vrsti biljaka. Na temelju razlika u primarnoj strukturi polipeptidnog lanca mirozinaze su klasificirane u četiri tipa: MA, MB, MC izolirani iz *B. napus*, *B. juncea* i *S. alba* i TGG izoliran iz *A. thaliana* (Hara i sur., 2000). Razlike u veličini mirozinaza pripisuju se različitom opsegu glikozilacije, budući da proteinski dijelovi MA, MB i MC mirozinaze imaju slične molekulske mase (Rask i sur., 2000). U ovom radu korišteno je antitijelo specifično za mirozinazu tipa 1 (TGG1), a u nedostatku istraživanja provedenih na dragoljubu (*Tropaeolum majus* L.) dobiveni rezultati uspoređeni su s postojećim rezultatima biljaka iz istog reda, kao što su *B. napus* L., *B. juncea* L., *S. alba* L. i *A. thaliana* L. Međutim iz dosadašnjih istraživanja provedenih na tim biljkama mogu se uočiti znatne razlike u rezultatima među različitim vrstama

biljaka istog reda, kao i među različitim kultivarima iste vrste. Opažanje da se mirozinaza nalazi samo u provodnom tkivu kod *A. thaliana* L. te različit izraz mirozinaze u sjemenu *A. thaliana* L. i *B. napus* L. dovelo je do pretpostavke da sustav mirozinaza – glukozinolat kod različitih vrsta biljaka ima različitu ulogu (Chen i Andreasson, 2001). Također u istraživanju koje su proveli Henderson i McEwen (1972) količina mirozinazne aktivnosti proučavana na kultivarima nastalim iz sjemenki *Sinapis alba* L., *Brassica campestris* L. I *Brassica napus* L. kao rezultat navodi da je mirozinazna aktivnost u *S. alba* L. 10 puta veća nego u *B. campestris* L., a aktivnost u *B. napus* L. malo veća nego u *B. campestris* L (Bones i Rossiter, 1996).

Najveća aktivnost mirozinaze javlja se u sjemenu i sadnicama (Zekić, 2013). U ovom diplomskom radu se iz tog razloga koristila sadnica mlade biljke koja je posijana s namjerom praćenja svih parametre razvoja od samog nicanja. Međutim činjenica da je mirozinazna aktivnost jako varijabilna i ovisi o mnogo faktora dovodi do toga da se dobiveni rezultati mogu samo približno usporediti sa dosad istraživanim vrstama iz reda Brassicales. U ovom radu praćena je fluorescentna imunoekspresija enzima mirozinaze tipa I u području korijena, stabljike i lista kroz četiri razvojne faze od nicanja biljke. Dobiveni rezultati prvi su ovakvi rezultati vezani za biljku dragoljub (*Tropaeolum majus* L.).

Od kraja 19. stoljeća vjerovalo se da je mirozinaza prisutna u posebnoj vrsti sekretornih stanica nazvanih mirozinske stanice koje uočavamo samo u ranoj fazi klijanja biljke (Bhat i Vyas, 2019). Ove se stanice smatraju idioblastima, a to su stanice abnormalnog oblika, veličine i sadržaja koje se razlikuju od susjednih stanica (Shirakawa i sur., 2022). S druge strane u organima bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) koji ne sadrže mirozinske stanice također je uočena značajna aktivnost mirozinaze. To dovodi do zaključka da enzim može postojati i van mirozinske stanice kao raspršene, pojedinačne stanice u podzemnom i provodnom tkivu (Höglund i sur., 1992; Bhat i Vyas, 2019). Dobivenim rezultatima u ovom diplomskom radu se potvrdilo da se mirozinaza kod biljke *Tropaeolum majus* L. također može pronaći u mirozinskim stanicama (Slika 37 A) i to u području osnovnih parenhimskih stanica korijena, dok u provodnom dijelu korijena (Slika 37 B-D), te u području stabljike (Slika 38 E-H) i lista (Slika 39 I-L) pronađen je imunofluorescencijski signal za enzim mirozinazu kod samostalnih i raspršenih stanica tkiva.

Karakteristična osobina mirozinskih stanica je njihov raspored duž lisne vaskulature. Mirozinske stanice se specifično razvijaju uz stanice floema (na abaksijalnoj (donjoj) strani lisne vaskulature) i nazivaju se mirozinske stanice floema. Stoga se u početku smatralo da su mirozinske stanice vrsta vaskularnih stanica. No, istraživanje na listovima biljke talijin uročnjak

(*A. thaliana* L.) potvrdilo je kako se mirozinske stanice diferenciraju izravno iz osnovnih meristemskih stanica i razvojno su neovisne o vaskulaturi lista (Shirakawa i sur., 2016). Imunofluorescencijskom i imunohistokemijskom tehnikom u ovom diplomskom radu dokazano je da kod biljke *Tropaeolum majus* L. također postoji znatna količina mirozinskih stanica u području floema, tj. mirozinske stanice floema. Najbolji rezultat zabilježen je u fazi 2 u području lista (Slika 43 E) gdje imunohistokemijski signal precizno pokazuje mirozinske stanice duž floemske lisne nervature.

Mirozinaza je do sada najviše istražena na tri biljke iz reda Brassicales, a to su uljana repica (*Brassica napus* L.), bijela gorušica (*Sinapis alba* L.) i talijin uročnjak (*Arabidopsis thaliana* L.) (Kissen i sur., 2009). Iako je većina do sada provedenih istraživanja usmjerena na područje sjemena i klice (embrija) postoje i neki rezultati na području korijena, stabljike i lista, koji su korišteni kao relevantni za usporedbu s dobivenim rezultatima. O lokalizaciji mirozinaze unutar stanice, posebno u odnosu na lokalizaciju glukozinolata, raspravlja se godinama. Koliko je ovaj sustav važan govori i činjenica da ga brojni autori smatraju taksonomski značajnim pa pojava i raspored mirozinskih stanica koriste kao jedan od kriterija za klasifikaciju biljaka reda Capparales (Zekić, 2013). Izvješća iz različitih tkiva biljaka variraju, ali sva testirana tkiva/organi pokazuju nekakvu mirozinaznu aktivnost (Bones, 1990). Osim u korijenu, kod odraslih biljaka sadržaj mirozinaze se smanjuje i mirozinazna aktivnost postaje niža (Bones i Rossiter, 1996). Rezultati u ovom diplomskom radu pokazuju da je imunofluorescentni signal pronađen u svim ispitivanim tkivima korijena, stabljike i lista u sve četiri ispitivane faze. Istraživanje je vršeno tijekom četiri tjedna kako bi mogli ustanoviti jačinu ekspresije u određenom razdoblju. Ovim istraživanjem dokazano je da i kod biljke *Tropaeolum majus* L. ekspresija mirozinaze tipa 1 opada rastom i starenjem biljke (Slika 40). Najjača imunoekspresija vidljiva je u području korijena, koji u razdoblju kada ima najnižu imunoekspresiju (faza 4) i dalje ima jaču imunoekspresiju od ostalih ispitivanih tkiva u svim fazama. Kod korijena je najjači imunofluorescencijski signal bio zabilježen u fazama 1 i 2 kad je organ i najviše narastao. Ostali istraživani dijelovi biljke (list i stabljika) u tom su periodu stagnerali u rastu. Stabljika je najjaču ekspresiju imala u fazi 2 i 3 rasta dragoljuba, s znatnim povećanjem imunofluorescencijskog signala u fazi 2. List biljke imao je tijekom svih faza rasta najslabiju ekspresiju enzima mirozinaze. Uz rezultate za sve tri regije biljke dragoljuba u sve četiri faze rasta dobivene imunofluorescencijskom tehnikom provedeno je bojanje imunohistokemijskom tehnikom radi usporedbe rezultata. Rezultati u sve četiri faze rasta kod korijena dragoljuba potvrđuju rezultate dobivene imunofluorescencijskom tehnikom, tj.

potvrđen je pronalazak enzima mirozinaze u korijenu biljke dragoljub (Slika 41; A-L), kao i kod organa stabljika (Slika 42; A-C) i list (Slika 43; A-I) iste biljke. Usporedni rezultati dobiveni dvijema tehnikama imunoekspresije prikazani su za sva tri istraživana dijela biljke, dok je manjak prikazanih usporednih rezultata u prvoj, drugoj i trećoj fazi stabljike i četvrtoj fazi razvoja kod lista uzrokovan nemogućnošću dobivanja reprezentativnih slika zbog nedostatka preparata spomenutih tkiva.

Rezultati dobiveni u diplomskom radu su potkrijepljeni i western blot analizom proteinskih ekstrakata iz različitih organa uljane repice (*Brassica napus* L.) pri različitim razvojnim faznim (Chen i Andreasson, 2001). Rezultati tog istraživanja pokazali su drastično smanjenje sadržaja glukozinolata tijekom ranog razvoja stadija biljke *B. napus* u skladu s ekspresijom mirozinaze i smanjenjem razine glukozinolata u lišću nakon njegovog sazrijevanja. Takvo djelovanje može se pripisati hidrolizi glukozinolata mirozinazom radi samozaštite biljke (Chen i Andreasson, 2001). Chen i Andreasson (2001) navode kako regulacijski mehanizmi uključeni u ekspresiju mirozinaze i *in vivo* razgradnju glukozinolata još uvijek nisu jasni, ali je poznato da dolazi do pojačane razgradnje glukozinolata pod utjecajem biotičkog i abiotičkog stresa što dovodi do remobilizacije sumpora i/ili dušika i učinkovitih odgovara na stresne uvijete. U listovima zrele biljke starim 25 dana pronađena je mirozinaza u stanicama simetrično postavljenim u parenhimu floema (Slika 19 A i B). Bojanjem starijih dijelova biljke poput plodova primjećuje se veća granulacija stanica (19 G), dok je kod mlađeg tkiva poput lapova bojanje homogeno (19 F). Svjetlosnom mikroskopijom mladog lišća dokazano je da su mirozinske stanice uvijek bile i šire i duže od stanica floemskog parenhima, te često dolaze u parovima (Andréasson i sur., 2001). Iz rezultata ovog diplomskog rada ne možemo precizno opisati granulaciju i položaj mirozinaze u mirozinskim stanicama tijekom vremena, ali iz nekih imunohistokemijski obojenih slika možemo vidjeti da je mirozinaza smještena uz sam rub stanice (Slika 43; G-I). Također nije bilo u mogućnosti vidjeti oblik i veličinu mirozinske stanica, što ostavlja dodatni prostor za istraživanje. Kod imunohistokemijskih rezultata možemo vidjeti signal duž cijele žile floema u području stabljike (Slika 42; A-C) i u području lista (Slika 43; D-F). Zanimljivo je istraživanje koje su proveli Bones i Iversen (1985.) i otkrili da u stanicama mirozina u različitim biljnim tkivima: rotkvice (*Raphanus sativus* L.) , bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i ognjice (*Iberis amara* L. nemaju sve mirozinaze jednak izgled. U tkivu mezofila iz kotiledona oblik mirozinske stanice može varirati od izodijametričnih stanica normalne veličine (Slika 20 A) do izdružene stanice s površinom 7 – 8 puta većom od okolnih stanica sličnih aleuronima (Slika 20 B). Oba oblika mogu se pronaći u rotkvi i bijeloj gorušici. Kod ognjice stanice mirozina iste

su veličine kao i okolne stanice (Slika 20 C). Daljnjim istraživanjem dragoljuba možemo odrediti oblik i veličinu mirozinskih stanica u tkivima ove biljke.

U ovom je radu pozitivnim imunoflorescencijskim signalom potvrđen enzim mirozinaza tipa 1 u osnovnom i provodnom tkivu svih istraživanih dijelova biljke. Iz dosadašnjih istraživanja možemo zaključiti da je isti rezultat potvrđen i kod biljke *B. napus* L. za razliku od *A. thaliana* L. kod koje je pozitivna ekspresija pokazala da je mirozinaza lokalizirana isključivo u mirozinskim stanicama floemskog parenhima i zaštitnim stanicama vegetativnog tkiva, dok u osnovnom tkivu nisu otkrivene stanice mirozina (Andersson i sur., 2009).

U dosadašnjim istraživanjima mirozinazna aktivnost najviše se javlja u području korijena. Kod biljke *B. napus* većina stanica mirozinaze je smještena u korteksu (Höglund i sur., 1991). Imunohistokemijskim bojanjem potvrdili smo da i u korijenu biljke *T. majus* L. korteks također obiluje mirozinazom (Slika 41 H). S druge strane rezultati kod biljke *A. thaliana* L. sugeriraju veću koncentraciju mirozinaze u gornjim dijelovima korijena (Bones, 1990). Kod dragoljuba je najjači imunoflorescencijski signal u području korijena prisutan u idioblastima matičnog tkiva parenhima (mirozinaza stanice) i u stanicama provodnog tkiva korijena. Što se tiče stabljike kod biljke *B. napus* L. većina enzima je lokalizirana u stanicama ksilema i korteksa (Höglund i sur., 1991.). Ti se rezultati gotovo poklapaju s onima dobivenim ovim diplomskim radom. Kod *T. majus* L. najjača imunoekspresija pronađena je u vaskularnom tkivu, velikim ksilemskim žilama i stanicama stijenki floema. Nisu pronađeni rezultati vezani za korteks. Statistički je utvrđeno da u području stabljike starenjem tkiva količina enzima postaje znatno niža. Suprotno tome iz radova provedenim na biljci *A. thaliana* L. možemo vidjeti da je mirozinazna aktivnost jača u starijim dijelovima stabljike (Bones, 1990). U mladim listovima *B. napus* L. signal je pronađen u području zaštitnih stanica, parenhima i u stanicama vaskularnog tkiva u blizini floema dok u starim listovima mirozinaza nije bila prisutna u zaštitnim stanicama (Höglund i sur., 1991.). Kod *T. majus* L. mirozinaza je pronađena u mladim stanicama osnovnog tkiva i na području ksilema s izraženim prstenastim zadebljanjem stanica parenhima. Kod biljke *A. thaliana* L. potvrđeno je da mladi listovi imaju jaču mirozinaznu aktivnost od starijih (Bones, 1990.), dok rezultati za regiju lista kod *T. mjaus* L. ne pokazuju znatnu imunoekspresiju ni u jednoj fazi istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

- Stabljika dragoljuba (*Tropaeolum majus* L.) se u potpunosti razvila do prve faze uzorkovanja dok kasnije neznatno napreduje. Znatan rast korijena uočen je u drugoj fazi, a u ostale dvije faze, kao i kod lista postoji trend laganog rasta.
- U trećem tjednu uočena je varijabilnost oblika lista. Veći (stariji) listovi poprimili su nazubljeni oblik, dok su manji (mlađi) listovi okruglog oblika.
- U četvrtom tjednu uzorkovanja dio stabljika je poprimio smeđu boju, dok je većina ostala zelena.
- Enzim mirozinaza tipa 1 pronađen je u svim istraživanim djelovima biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.), a to su korijen, stabljika i list, u sve četiri faze istraživanja.
- Mirozinaza je u biljci prisutna u idioblastima abnormalnog oblika, veličine i sadržaja koji se zovu mirozinske stanice koje se najčešće javljaju u ranoj fazi klijanja biljke i u obliku pojedinačnih raspršenih stanica u osnovnom i provodnom tkivu.
- Imunoekspresija mirozinaze tipa 1 u biljci dragoljub opada rastom i starenjem biljke.
- Najizraženiji imunofluorescencijski signal u području korijena zabilježen je u idioblastima matičnog tkiva parenhima (mirozinske stanice) i u stanicama vaskularnog tkiva korijena u fazi 1 i fazi 2 razvojnog razdoblja, tj. u periodu od 20 – 30 dana nakon sijanja biljke.
- Za razliku od stabljike i lista koji najjači imunofluorescencijski signal pokazuju u drugoj fazi razvoja, korijen najjači imunofluorescencijski signal pokazuje u prvoj razvojnoj fazi.
- Jačinu imunoekspresije u četvrtoj fazi razvoja korijena možemo izjednačiti s onom druge faze razvoja stabljike, što je ujedno i najveća zabilježena imunoekspresija u ostalim ispitivanim dijelovima biljke.
- U stabljici je najjači imunofluorescencijski signal zabilježen u drugoj i trećoj fazi razvoja, tj. u periodu od 25-30 dana nakon sijanja s izrazitom dominacijom u drugoj fazi.
- U području stabljike biljke dragoljub najjači imunofluorescencijski signal zabilježen je u provodnom tkivu, velikim ksilemskim žilama i stanicama stijenki floema.
- U području lista biljke dragoljub pozitivan imunofluorescencijski signal enzima mirozinaza tipa 1 pronađen je u područje ksilema (s izraženim prstenastim zadebljanjem) provodnih elemenata i parenhimskom osnovnom tkivu

- Kod biljke dragoljub potvrđena je prisutnost mirozinskih stanica duž lisne vaskulature, uz stanice floema koje se zovu mirozinske stanice floema.
- Regija lista kod dragoljuba ne pokazuje značajnu razinu imunoekspresije mirozinaze u niti jednoj fazi istraživanja.
- Imunohistokemijskim bojanjem radi usporedbe rezultata dobivenih imunofluorescencijskom tehnikom, uočen je signal duž cijelog floema u listu i stabljici i u korteksu korijena dragoljuba.

LITERATURA

1. Ahuja I, De Vos R C, Rohloff J, et al. Arabidopsis myrosinases link the glucosinolate-myrosinase system and the cuticle. *Sci Rep.* 2016;6:38990.
2. Al-Robai, Sami, Mohamed, Haidar, Ahmed, Abdel A, Kordofani, Maha. Tropaeolaceae: A New Family Record for the Flora Of Saudi Arabia. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy.* 2022;29:79-84.
3. Andersson D, Chakrabarty R, Bejai S, Zhang J; Rask L; Meijer J. Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. 2009;70(11-12), 1345–1354.
4. Andréasson E, Jørgensen L B, Höglund A S, Rask L, Meijer J. Different Myrosinase and Idioblast Distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology,* 2001;127(4), 1750–1763.
5. Bhat R, Kaur T, Khajuria M, et al. Purification and characterization of a novel redox-regulated isoform of myrosinase (b-thioglucoside glucohydrolase) from *Lepidium latifolium* L. *J Agric Food Chem.* 2015;63: 10218–10226.
6. Bhat R, Vyas D. Myrosinase: insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions. *Crit Rev Biotechnol.* 2019;39(4):508-523.
7. Bones A M, Rossiter J T. *The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. Physiologia Plantarum,* 1996;97(1), 194–208.
8. Bones A M, Thangstad O P, Haugen O A, Espevik T. Fate of Myrosin Cells: Characterization of Monoclonal Antibodies Against Myrosinase, *Journal of Experimental Botany,* 1991;(42):1541–1550.
9. Bones A M. Distribution of β -Thioglucosidase Activity in Intact Plants, Cell and Tissue 6*Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany.* 1990;41:737–744,
10. Bones A, Iversen T-H. MYROSIN CELLS AND MYROSINASE, *Israel Journal of Botany.* 1985;34:2-4, 351-376
11. Burmeister W P, Cottaz S, Driguez H, Iori R, Palmieri S, Henrissat B. The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure.* 1997;5(5):663-675.
12. Burmeister W P, Cottaz S, Rollin P, et al. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J Biol Chem.* 2000;275: 39385–39393.

13. Bussy, A. (1840.). Mémoire sur la formation de l'huile essentielle de Moutarde. Impr. Fain et Thunot, Paris
14. Calil Brondani J, Ferreira Cuelho C H, Damo Marangoni L, de Lima R, Gaube Guex C, de França Bonilha I, Palermo Manfron M. Traditional usages, botany, phytochemistry, biological activity and toxicology of *Tropaeolum majus* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2016;15(4),264-273.
15. Carlson K D, Kleiman R. Chemical Survey and Erucic Acid Content of Commercial Varieties of Nasturtium, *Tropaeolum majus* L. *JAOCS*. 1993;70(11):1145-1148.
16. Chen S, Andreasson E. Update on glucosinolate metabolism and transport. *Science Direct. Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(9), 743–758.
17. Das S, Tyagi A K, Kaur H. Cancer modulation by glucosinolates. A review. *Current Science*, 2000;79(12), 1665–1671.
18. Ettliger M, Dateo G P, Harrison B, et al. Vitamin C as a coenzyme: the hydrolysis of mustard oil glucosides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1961;47:1875–1880.
19. Guignard L. Recherchessur la localisation des principesactifs des cruciferes. *J Bot Paris*. 1890;4:385 –394.
20. Halkier B A, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57:303-333.
21. Hara M, Fujii Y, Sasada Y, Kuboi T. CDNA cloning of radish (*Raphanus sativus*) myrosinase and tissue-specific expression in root. *Plant Cell Physiol*. 2000;41(10):1102-1109.
22. Heinricher E. Ueber eiweissstoffe fuhrende idioblasten bei einigen cruciferen. *Berdt Bot Ges*. 1884;2: 463–466.
23. Höglund A S, Lenman M, Falk A, Rask L. Distribution of myrosinase in rapeseed tissues. *Plant Physiol*. 1991;95(1):213-21.
24. Höglund A S, Lenman M, Rask L. Myrosinase is localized to the interior of myrosin grains and is not associated to the surrounding tonoplast membrane. *Plant Science*, 1992;85(2), 165–170.
25. Holst B, Williamson G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Natural Product Reports*. 2004;21:425–47.
26. Husebye H, Arzt S, Burmeister W P, et al. Crystal structure at 1.1 Angstroms resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to beta-glucosidases. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35:1311–1320.

27. Jakubczyk K, Janda K, Watychowicz K, Łukasiak J, Wolska J. Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2018;69(2):119-126.
28. James D C, Rossiter J T. Development and characteristics of myrosinase in *Brassica napus* during early seedling growth. *Physiologia Plantarum*, 1991;82(2), 163–170.
29. Jørgensen L B. Myrosin cell and dilated cisternae of endoplasmic reticulum in the order Capparales. *Nordic Journal of Botany*.1981;1:433-45.
30. Kissen R, Rossiter J T, Bones A M. The ‘mustard oil bomb’: not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. 2009;8(1), 69–86.
31. Kleinwächter M, Schnug E, Selmar D. The glucosinolate-myrosinase system in nasturtium (*Tropaeolum majus* L.): variability of biochemical parameters and screening for clones feasible for pharmaceutical utilization. *J Agric Food Chem.* 2008;56(23):11165-11170.
32. Kopjar M, Šubarić D, Piližota V. Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku.* 2012;1(1)22-35.
33. Li M, Sack F D. Myrosin idioblast cell fate and development are regulated by the arabidopsis transcription factor FAMA, the auxin pathway, and vesicular trafficking. *Plant Cell.* 2014;26:4053–4066
34. MacGibbon D B, Allison R M. A glucosinolase system in the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *New Zeal J Sci.* 1968;11:440–446.
35. Masaru O, Tadao H. Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase. *Agric Biol Chem.* 1972;36: 2495–2503.
36. Nagashima Z, Uchiyama M. Possibility that myrosinase is a single enzyme and mechanism of decomposition of mustard oil glucoside by myrosinase. *J Agric Chem Soc Jpn.* 1959;23:555–556.
37. Navarro-González I, González-Barrio R, García-Valverde V, Bautista-Ortín AB, Periago MJ. Nutritional composition and antioxidant capacity in edible flowers: characterisation of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Int J Mol Sci.* 2014;16(1):805-822.
38. Pessina A, Thomas R M, Palmieri S, Luisi P L. An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization. *Arch Biochem Biophys.* 1990;280(2):383-389.

39. Rask L, Andréasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol.* 2000;42(1):93-113.
40. Rop O, Mlcek J, Jurikova T, Neugebauerova J, Vabkova J. Edible Flowers – A New Promising Source of Mineral Elements in Human Nutrition. *Molecules.* 2012;17:6672-6683.
41. Sandberg M, Holly O M. Note on myrosin. *J Biol Chem.* 1932;96:443–447.
42. Sehrawat A, Sougrakpam Y, Deswal R. Cold modulated nuclear S-nitrosoproteome analysis indicates redox modulation of novel Brassicaceae specific, myrosinase and napin in *Brassica juncea*. *Environ Exp Bot.* 2018. 10.1016/j.envexpbot.2018.10.010.
43. Shirakawa M, Tanida M, Ito T. The Cell Differentiation of Idioblast Myrosin Cells: Similarities With Vascular and Guard Cells. *Front. Plant Sci.* 2022;12:829541.
44. Shirakawa M, Ueda H, Nagano AJ, et al. FAMA is an essential component for the differentiation of two distinct cell types, myrosin cells and guard cells, in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2014;26:4039–4052.
45. Shirakawa M, Ueda H, Shimada T, et al. Myrosin cells are differentiated directly from ground meristem cells and are developmentally independent of the vasculature in *Arabidopsis* leaves. *Plant Signal Behav.* 2016;1:e1150403.
46. Tani N, Ohtsuru M, Hata T. Isolation of myrosinase producing microorganism. *Agric Biol Chem.* 1974;38: 1617–1622.
47. Travers-Martin N, Kuhlmann F, Müller C. Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2008;46:506- 516
48. Vrca I, Burčul F, Blažević I, Bratanić A, Bilušić T. Comparison of gastrointestinal stability of isothiocyanates from *Tropaeolum Majus* L. *Altum* using in vitro and ex vivo digestion methods. *Croatian journal of food science and technology.* 2021;13(2):160-166.

MREŽNE STRANICE

1. Anonymus (ed.); Dragoljub – Tropaeolum majus; Plantea – Priroda i biljke;
On-line URL: <https://www.plantea.com.hr/dragoljub/> ; Pristupljeno: 15.10.2022.
2. Christenhusz, Maarten J. M. (Prosinac 2012.); 746. TROPAEOLUM MAJUS: Tropaeolaceae; Curtis's Botanical Magazine;
On-line URL: <http://www.jstor.org/stable/45066223> ; Pristupljeno: 15.10.2022.
3. Špoljar, S. (04.01.2016.); Dragoljub – izvor vitamina C u svakom vrtu; Agroklub:
Online URL: <https://www.agroklub.com/hortikultura/dragoljub-izvor-vitamina-c-u-svakom-vrtu/22587/> ; Pristupljeno: 15.10.2022.
4. Anonymus (04.08.2020.); Dragoljub: Dekorativna i lekovita puzavica, laka za gajenje; Objektiv; Online URL: <https://objektiv.rs/vest/273571/dragoljub-dekorativna-i-lekovita-puzavica-laka-za-gajenje-fotovideo/> ; Pristupljeno: 17.10.2022.
5. Osnat Amir (30.07.2023.); Tropaeolum; Wikipedija;
Online URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tropaeolum> ; Pristupljeno: 12.12.2022.
6. Lalicki I (13.09.2012.); Dragoljub, začinsko bilje (Salata sa dragoljubom); So i biber;
Online URL: <https://www.soibiberblog.com/dragoljub-zacinsko-bilje-salata-sa-dragoljubom/> ; Pristupljeno: 15.5. 2023.
7. Zekić M (2013.); Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae. Institut Ruđer Bošković; Online URL: https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fbib.irb.hr%2Fdatoteka%2F661490.MARINA_ZEKIC.docx&wdOrigin=BROWSELINK ; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu; Pristupljeno: 20.12.2022.
8. Vukoja N, Hančić S, Korać P (2017); Razvoj metoda imunohistokemijskog bojenja i optimizacija protokola za detekciju transkripcijskog faktora BACH2; Portal hrvatskih znanstvenih i stručnih časopisa – Hrcak; Online URL: <https://hrcak.srce.hr/file/281578>; Pristupljeno: 29.5.2023.
9. Anonymus (ed.); Immune Chromogenic Reagent (Dual Staining II); Celnovte – Innovation for pathology diagnosis; Online URL: <https://www.celnovte-bio-tech.com/immune-chromogenic-reagent-double-stain-ii/>; Pristupljeno: 29.5.2023.
10. Anonymus (ed.), OSNOVE IMUNOHISTOKEMIJSKIH METODA; MEDRI;
Online URL: https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/IMUNOHISTOKEMIJA_I_IN_SITU_HIBRIDIZACIJA.pdf;
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci; Pristupljeno: 29.5.2023.

METODIČKI DIO

| | | |
|---|----------------|----------------|
| Ime i prezime učitelja | Predmet | Razred |
| Laura Kurić | Biologija | 3. razred (SŠ) |
| Nastavna tema <i>Odrediti na osnovu godišnjeg izvedbenog kurikulumuma (GIK).</i> | | Datum |
| Uloga biomolekula u metaboličkim procesima | | 6.9.2023. |
| Važnost proteina u živim organizmima | | |

| | |
|--|---|
| Cilj nastavne teme <i>Odrediti u skladu s ciljem poučavanja dijela nastavne teme.</i> | |
| Sticanje znanja o strukturi i ulozi proteinina u živim organizmima | |
| Ključni pojmovi <i>Pojmovi koje učenik treba usvojiti uz poučavanje.</i> | Temeljni koncepti <i>Ideje koje učenici trebaju usvojiti na razini razumijevanja i/ili primjene (uz pomoć konceptualnog okvira poučavanja biologije).</i> |
| Aminokiselina, peptidna veza, enzim, biokatalizator, energija aktivacije, hormoni, protein, struktura proteina, esencijalne i neesencijalne aminokiseline, hemoglobin | Proteini su osnovni građevni element stanice, tj. organizma. Glavni izvor proteina u našoj prehrani čini meso, a ima ih i u orašastim plodovima, gljivama, jajima, i mlijeku. Proteini su polimeri aminokiselina. Neke aminokiseline organizam sam sintetizira (neesencijalne), a druge mora unijeti hranom (esencijalne). Aminokiseline se međusobno povezuju peptidnom vezom. Polipeptidni lanci mogu se, ovisno o redosljedu i tipu svojih aminokiselina, savijati, nabirati i omatati u različite oblike. Biološka uloga proteina ovisi upravo u njegovom konačnom prostirnom obliku. Uloge proteina u organizmu su razne, na primjer keratin se nalazi u kosi, noktima i koži ljudi, kolagen izgrađuje kožu, kosti, tetive, svilu proizvode kukci i pauzi, dok hemoglobin sadrži i neproteinski dio hem s ionom željeza koji daje krvi crvenu boju. Enzimi olakšavaju kemijske procese poput zriobe plodova, zgrušavanja krvi, rasta listova,... a pri tom se ne troše i ne mijenjaju. Enzimi snižavaju energiju aktivacije, a ubrzavaju samo jednu određenu vrstu reakcije pa smatramo da enzim "prepoznaje" svoj supstrat. One enzime koji djeluju u živim sustavima zovemo još i biokatalizatori. |
| Kontekst poučavanja koncepta <i>Sadržajni okvir učenja (na kojim će se primjerima učiti).</i> | |
| Na temelju dijaloga o svakodnevnom životu i slikovnim prikazima učenici donose zaključke o prisutnosti proteina u prehrani. Uz pomoć vidozapisa i slikovnog prikaza učenici uče što su aminokiseline i način na koji nastaje peptidna veza. Promatrajući sliku učenici uče strukture proteina i razlike u fazama strukturiranja. Promatrajući slike vodimo dijalog, te zaključujemo gdje se u svakodnevnom životu susrećemo s proteinima. Pomoću slikovnog prikaza i grafa učimo što su enzimi i koji je princip njihovog djelovanja. Uz pomoć pokusa učimo o djelovanju enzima i rješavamo radni listić. Ponavljjanje je zamišljeno u vidu problemskog zadatka kojeg svi zajedno rješavamo uz pomoć slajdova. | |

| | |
|--|---|
| Odgajno-obrazovni ishodi <i>Odabрати i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.</i> | |
| BIO SŠ A.3.1. | Povezuje građu i ulogu staničnih dijelova. |
| BIO SŠ C.3.1. | Opisuje uloge ugljikohidrata, masti i proteina u organizmu. |

| | |
|---------------|---|
| BIO SŠ D.3.1. | Promatra i prikuplja podatke te donosi zaključke tijekom učenja i poučavanja. |
| BIO SŠ D.3.1. | Raspravlja o prikazanim i opisanim rezultatima te donosi argumentirane zaključke. |

| Očekivanja međupredmetnih tema <i>Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.</i> | |
|--|---|
| goo C.5.1. | Aktivno sudjeluje u građanskim inicijativama: Odgovorno i osviješteno sudjeluje u javnim raspravama i aktivnostima u školi i lokalnoj zajednici. |
| odr A.5.1. | Kritički promišlja o povezanosti vlastitoga načina života s utjecajem na okoliš i ljude: U vlastitome životu primjenjuje održiva rješenja s ciljem smanjivanja negativnih utjecaja na okoliš i ljude. |
| osr A.5.3. | Razvija svoje potencijale: Prema preuzetim zadacima treba biti odgovoran i ustrajati u njihovu ispunjavanju. |
| osr B.5.2. | Suradnički uči i radi u timu: Suraduje, organizira, izvršava svoj zadatak, postavlja hipoteze, razvija svoju ulogu u timu, donosi odluke. |
| uku D.4/5.2. | Suradnja s drugima: Učenik ostvaruje dobru komunikaciju s drugima, uspješno suraduje u različitim situacijama i spreman je zatražiti i ponuditi pomoć. |

| Br. Ishoda u razradi(RI/IA) | Razrada ishoda <i>Koristiti prema Kurikulumu.</i> Ishodi aktivnosti <i>Prema potrebi dodati i specifično razraditi ishod iz razrade ishoda.</i> | Zadatak/ primjer pitanja za provjeru <i>Pitanja trebaju polaziti od razine propisane Kurikulumom (minimum), ali treba planirati i pitanja više razine usvojenosti.</i> | KR | PU |
|------------------------------------|--|--|--------------------------------|--------------------------------------|
| BIO SŠ A.3.1. | Povezuje građu i uloge tkiva | <ul style="list-style-type: none"> Što možemo zaključiti iz slikovnog prikaza primarne strukture? Što mogu zaključiti o razlici između prve i druge strukture prikazane slikama? Što nastaje dodatnom spiralizacijom i oblikovanjem sekundarne strukture događa? Što određuje ulogu pojedinog proteina? Kakva je kvartarna struktura proteina? Koja je uloga hema u hemoglobinu? | II II II I I II | +/- +/- + +/- +/- +/- |

| | | | | |
|---|---|--|------------------------|------------------------|
| BIO SŠ C.3.1. | Opisuje uloge ugljikohidrata, masti i proteina u organizmu. | <ul style="list-style-type: none"> Koji su proteini zaslužan za izgradnju poprečnoprugastih mišića? Koji je protein najzastupljeniji u području kosti, kože i tetiva? Oslabljeni nokti i kosa ukazuju na manjak kojeg proteina? Koja je uloga hemoglobina u sastavu crvenih krvnih stanica? | I I II I | + + + + |
| BIO SŠ D.3.1. | Promatra i prikuplja podatke te donosi zaključke tijekom učenja i poučavanja. | <ul style="list-style-type: none"> Objasni kako djeluje enzim amilaza? Objasni na koji način učenici mogu iskoristiti dobivene rezultate za objašnjenje utjecaja pH vrijednosti okoline na aktivnost enzima amilaze. Odredi tri kontrolne varijable u provedenom istraživanju. Odredi koja krivulja pripada kojoj tvari i objasni svoj odgovor. | III III II II | +/- - +/- +/- |
| BIO SŠ D.3.1. | Raspravlja o prikazanim i opisanim rezultatima te donosi argumentirane zaključke. | <ul style="list-style-type: none"> Učenici su zaključili da amilaza pokazuje najveću aktivnost pri pH-vrijednosti 7. Međutim, učenici su ubrzali s donošenjem zaključka koji možda i nije znanstveno ispravan. Objasni zašto? Na temelju svog znanja o enzimima i njihovoj strukturi, objasni rezultate dobivene pri vrijednostima pH 1 i pH 11. Prouči što su inhibitori enzima i kakvi oni mogu biti. | III II II | +/- + + |
| <p>Kognitivna razina (KR): I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema Procjena uspješnosti učenja (PU): - odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika Br. ishoda u razradi (RI): dodati prema odgovarajućem broju iz dokumenta Kurikuluma Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda (npr. OŠ PRI A.5.1.2 Uočava na temelju praktičnih radova da su tvari građene od sitnih čestica; BIO OŠ B.8.4.9. Povezuje mitozu s razmnožavanjem jednstaničnih te s rastom i obnavljanjem višestaničnih organizama; BIO SŠ C.3.2.2. Analizira prijenos tvari kroz membranu/membranom s aspekta korištenja energije) (IA): broj ishoda aktivnosti generirati prema nadređenom broju (RI) ishoda u razradi (npr. OŠ PRI A.5.1.2.1. Zaključuje na temelju praktičnog rada da je u morskoj vodi otopljena sol.)</p> | | | | |

Tijek

Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata) - Kratki tablični pregled strukture nastavnog sata s iskazanim dominantnim aktivnostima i sociološkim oblicima rada te predviđenim trajanjem za svaki strukturni element sata (po potrebi dodati retke tablice). Uz svaku aktivnost obavezno navesti oznaku ishoda u razradi (prema Kurikulumu Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda) koji se njome ostvaruje.

| Tip sata | Obrada novog nastavnog sadržaja | Trajanje | 45 minuta | | | | |
|-----------------|--|--|------------------|-----------|--------|------------|----------------|
| BR. | STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA | DOMINANTNA AKTIVNOST | BR. ISHODA I MPT | KORISTITI | METODA | OBLIK RADA | TRAJANJE (min) |
| | Početni dio | Prva kliznica predstavlja nekoliko slika kojima je poveznica da obiluju proteinima. Učenicima postavljam pitanje da pokušaju zaključiti što je zajedničko svim namirnicama sa slike. Nakon toga zapisujem naslov i pitam učenike da mi nabroje sve činjenice kojih se mogu sjetiti o proteinima a ja ih na ploču razvrstavam u obliku umne mape. | U/N | PP S | D R | I | 5 |

| | | | | | | |
|----------------------|---|-----|--------------------|--------------|---|----|
| Središnji dio | Učenicima postavljam pitanje znaju li od čega su građeni proteini. Puštam im videozapis i promatramo kako se aminokiseline povezuju u poliproteinske lance uz tvorbu peptidne veze. Postavljam pitanje znaju li koja je važnost aminokiselina i razvrstavamo ih ne esencijalne i neesencijalne. Uz pomoć kliznice učenici bitne značajke aminokiselina zapisuju u bilježnice. Uz pomoć slikovnog prikaza ješ jednom ponavljamo kako se aminokiseline povezuju. Prozivam jednog učenika na ploču i dajem zadatak da na slici koja predstavlja kemijsku reakciju prstom pokaže gdje se stvorila peptidna veza. | U/N | PP V S | D R | I | 6 |
| | Uz pomoć slike promatramo različite strukture proteina i razgovaramo o razlici u obliku i ulozi pojedine strukture. Postavljam pitanje što možemo zaključiti iz slikovnog prikaza primarne strukture. Postavljam pitanje što mogu zaključiti o razlici između prve i druge strukture. Postavljam pitanje što se potom događa i kakvog je oblika tercijarna struktura. Postavljam pitanje što mogu zaključiti iz četvrte slike i znaju li zašto je dio molekule obojan tamno plavom bojom. | U/N | PP S | D R | I | 5 |
| | Uz pomoć slika donosimo zaključke o primjerima proteina kojeg poznajemo iz svakodnevno života. Postavljam pitanje da vidim mogu li se učenici sjetiti nekog primjera. Kažem učenicima da u paru prodiskutiraju o ovoj temi, a potom tražim da mi predlože svoje primjere. Učimo imena, gdje ih sve možemo pronaći i koje su njihove uloge. Ako učenici ne znaju navesti neki primjer, postavljam pitanje jesu li ikad čuli za kolagen, keratin, hemoglobin,... i zbijaju li koja je njihova uloga. Postavljam pitanje znaju li od kojeg je materijala građena paukova mreža. | U/N | PP S | R F | P | 5 |
| | Učenicima dijelim u grupe po četvero kako bi u grupi proveli eksperiment i otkrili što su i kako djeluju enzimi. Dijelim učenicima radne listove, a sam sadržaj je popraćen i na kliznicama. Učenici u grupi raspravljaju o rezultatima eksperimenta i donose zaključke te ih zapisuju na radne listiće. Provjeravamo rezultate i riješene zadatke. Na temelju izvedenog pokusa i riješenog radnog listića postavljam učenicima pitanje znaju li kako se zove tvar koju su upravo dokazali. Uvodimo pojam enzima i objašnjavam učenicima na koji način djeluju enzimi. Prozivam jednog učenika na ploču da mi pokuša objasniti graf tijeka kemijske reakcije sa i bez prisutnosti enzima. Uz pomoć slikovnog prikaza objašnjavam model "ključ-brava". | U | RL E PP G | PR R C | G | 15 |
| Završni dio | Na kraju sata učenicima dijelim radni listić s ponavljanjem. Ponavljanje je zamišljeno u obliku problemskog zadatka kojeg će učenici riješiti na radnom listu, a rezultate ćemo provjeravati praćenjem zadataka na kliznicama. Ukoliko ne uspiju dovršiti na satu, radni listić ostaje za domaću zadaću. | U/N | RL PP | PR | G | 8 |
| | Na kraju sata provjeravam usvojenost gradiva s učenicima na način da u isto vrijeme svatko za sebe podigne palac gore ako je u potpunosti razumio gradivo, palac vodoravno ako mu je | U | I | R | I | 1 |

dio gradiva ostao nejasan ili palac dolje, ako mu je više od pola gradiva ostalo nejasno.

Nositelji aktivnosti: N – nastavnik, U – učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)

Koristiti u izvedbi: RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, VL – video lekcija, APP – digitalni alat, P/SU – platforma/sustav učenja na daljinu, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL – anketni listić TM – tekstualni materijali, S – slikovni zapis, G – grafički prikaz (dodati prema potrebi)

Metode: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje

Oblici rada: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno

Materijalna priprema *Popis nastavnog materijala, izvora znanja, sredstva i pomagala, odnosno svega što je potrebno pripremiti za uspješno odvijanje nastave prema postavljenom cilju i zamišljenom planu. Treba biti uključena izvora stvarnost kad god je to moguće, kao i nastavna sredstva te nastavna pomagala koja će se koristiti tijekom poučavanja i učenja.*

Izvorna stvarnost: komadić pileće jetre

Nastavna sredstva: eksperiment, PPT prezentacija, list za ponavljanje, Internet, živa riječ nastavnika

Nastavna pomagala: LCD projektor, ploča, mobitel

Plan učeničkog zapisa *Može biti plan ploče ili zapis koji nastaje na temelju drugih poticaja.*

VAŽNOST PROTEINA U ŽIVIM ORGANIZMIMA

AMINOKISELINE: *esencijalne (unosimo putem hrane)

*neesencijalne (organizam ih sam sintetizira)

STRUKTURA PROTEINA:

- **Primarna struktura** (Redosljed aminokiselina u proteinu)
- **Sekundarna struktura** (Dio polipeptidnog lanca poprima oblik zavojnice ili nabranih ploča)
- **Tercijarna struktura** (Polipeptidni lanac se savija trodimenzionalno u kuglasti ili nitasti oblik; definira ulogu proteina)
- **Kvartarna struktura** (Dvije ili više podjedinice s tercijarnom strukturom udružene u kompleks u kojemu se često nalazi i neproteinska komponenta)

PRIMJERI PROTEINA:

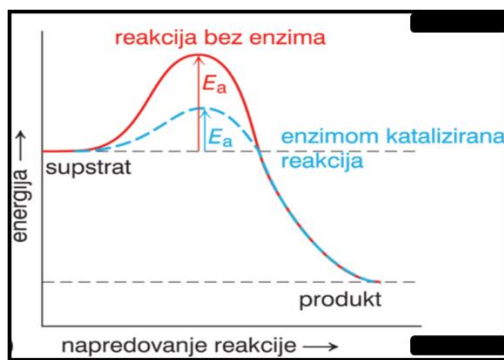
- Aktin i miozin (izgradnja poprečno prigrastih mišića)
- Keratin (kosa, nokti, koža, rogovi, kopita, perje, kljun,...)
- Kolagen (koža, kosti, tetive, leća oka,...)
- Hemoglobin (sadrži i neproteinski dio; prenosi kisik)

ENZIMI: *ubrzavaju kemijsku reakciju, a pritom se sami ne troše i ne mijenjaju

*smanjuju energiju aktivacije

*"Prepoznaju supstrat" – jedan enzim sudjeluje u jednoj vrsti reakcije

*Biokatalizatori – ubrzavaju kemijske reakcije u živim bićima



Vrednovanje *Različiti pristupi vrednovanju.*

| Vrednovanje za učenje | Vrednovanje kao učenje | Vrednovanje naučenog |
|---|--|--|
| Kroz pitanja koja postavljam tijekom nastavnog sata nakon svake kliznice provjeravam jesu li učenici sve razumjeli te objašnjavam ono što nisu. | Na samom kraju sata učenike pitam je li im sve jasno te treba li im još što pojasniti. | Na samom kraju sata učenicima dijelim radni listić s problemskim zadatkom. Prozivajući učenike provjeravam točnost odgovora i jesu li usvojili obrađeni sadržaj. |

Prilagodba za učenike s teškoćama u učenju *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Učenik s teškoćama u učenju dobit će zadatak uz pomoć slike izraditi mofelel djelovanja enzima od plastelina.

Prilagodba za darovite učenike *Navesti način prilagodbe učenja mogućnostima i potrebama učenika te priložiti zadatke prilagodbe.*

Nema darovitih učenika.

Prilozi *Popis materijala koji će se koristiti u nastavi (radni listovi, ispis PP prezentacije i ostali materijal).*

Priručnik Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilište u Splitu

ULOGA BIOMOLEKULA U METABOLIČKIM PROCESIMA

Važnost proteina u živim organizmima

Metodička priprema nastavnog sata biologije
Diplomski rad

AMINOKISELINE

ESENCIJALNE
Organizam ih ne može sam sintetizirati
Unosimo ih putem hrane

NEESENCIJALNE
Organizam ih sam sintetizira



PEPTIDNA VEZA

- ▶ Postoji ukupno 20 aminokiselina
- ▶ Njihovom kombinacijom nastaju različiti proteini
- ▶ Redoslijed aminokiselina zadan je genetskim kodom pod čijom je kontrolom sinteza tog proteina

PROTEINI



AKTIN I MIOZIN
nitasti proteini koji sudjeluju u izgradnji poprečnooprugastih mišića

KERATIN
protein kojeg ima u kosi, noktima i koži ljudi, gradi i pandže, rogove i kopita sisavaca, perje i kijun ptica,...

KOLAGEN
protein koji je najzastupljeniji, izgrađuje kožu, kosti, tetive, leću oka,...

Proteini oko nas?

▶ Možete li se sjetiti gdje sve susrećemo bjelancevine u svakodnevnom životu?



▶ Osnovni građevni elementi stanice
▶ Polimeri aminokiselina

Struktura proteina

a) **Primarna struktura**
• Redoslijed aminokiselina u proteinu



b) **Sekundarna struktura**
• Dio polipeptidnog lanca poprima oblik zavojnice ili nabranih ploča

c) **Tercijarna struktura**
• Polipeptidni lanac se savija trodimenzionalno u kuglasti ili nitasti oblik

d) **Kvartarna struktura**
• Samo kod nekih proteina
• Dvije ili više podjedinice s tercijarnom strukturom udružene u kompleks u kojemu se često nalazi i neproteinska komponenta

▶ 3D struktura definira ulogu proteina

PROTEINI

▶ Koja je uloga hemoglobina u sastavu crvenih krvnih stanica?

HEMOGLOBIN
Izgrađen od proteina i neproteinskog djela molekule hema, koji sadrži ion željeza u središtu



Pokus: Kako djeluju enzimi?



POSUDE

- ▶ Drveni stalak
- ▶ 2 x epruvete
- ▶ 2 x kapaljke
- ▶ Rižež
- ▶ 5 x satno staklo



KEMIKALIJE

- ▶ 5% otopina vodikova peroksida (H_2O_2)
- ▶ Manganov dioksid



OSTALO

- ▶ Pileća jetra
- ▶ Jabuka
- ▶ Limunov sok
- ▶ Voda

Pokus: Kako djeluju enzimi?



A

- ▶ U dvije epruvete ulij po 5 mL otopine vodikovog peroksida
- ▶ U prvu epruvetu dodaj komadić svježeg pilećeg jetre
- ▶ U drugu epruvetu dodaj kristale manganova oksida



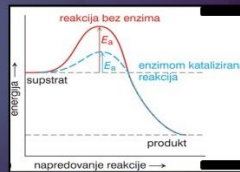
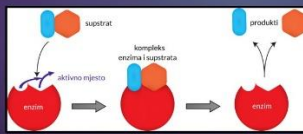
B

- ▶ Razrežite jabuku na kriške i stavite svaku na jedno satno staklo
- ▶ Prvu krišku stavite na radijator, drugu u posudicu s vodom, na treću nakapajte limunov sok, četvrtu izbijajte rižežom, a petu ostavite bez daljnjeg pokusa

Riješi radni listić

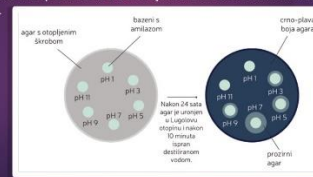
PROTEIN – ENZIM SUSTAV

- ▶ ENZIMI → ubrzavaju kemijske reakcije, a sami se pritom ne mijenjaju i ne troše
- ▶ Jedan enzim može ubrzati samo jednu vrstu reakcije "prepoznaje supstrat"
- ▶ BIOKATALIZATORI → ubrzavaju kemijske reakcije u živim bićima
- ▶ Djeluje tako da smanjuje energiju aktivacije



PONAVLJANJE

- Na nastavi biologije učenici žele istražiti utjecaj pH-vrijednosti okoline na aktivnost enzima amilaze. Pritom će se koristiti pločana agara koje u sebi sadrže otopljeni škrob. Nakon što se agar ohladio i stvrdnuo, učenici su u njemu s pomoću kružnog bušača napravili šest malih bazena i u svaki stavili jednak volumen amilaze te ga dopunili otopinama pufera različitih pH-vrijednosti. Petrijevke s agarom ostavljene su u inkubatoru na temperaturi od 36°C tijekom 24 sata. Rezultati i metoda istraživanja vidljivi su na slici.

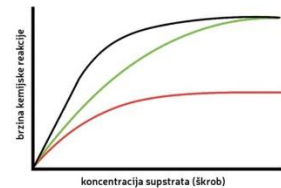


PONAVLJANJE

- Objasni kako djeluje enzim amilaza?
- Objasni na koji način učenici mogu iskoristiti dobivene rezultate za objašnjenje utjecaja pH vrijednosti okoline na aktivnost enzima amilaze.
- Učenici su zaključili da amilaza pokazuje najveću aktivnost pri pH-vrijednosti 7. Međutim, učenici su ubrzali s donošenjem zaključka koji možda i nije znanstveno ispravan. Objasni zašto?
- Na temelju svog znanja o enzimima i njihovoj strukturi, objasni rezultate dobivene pri vrijednostima pH 1 i pH 11.
- Odredi barem tri kontrolne varijable u tom istraživanju.
- Prouči što su inhibitori enzima i kakvi oni mogu biti.

PONAVLJANJE

- ▶ PROMOTRI GRAFIKON:
- ▶ Tvari A i B inhibitori su enzima amilaze. Jedna od njih (tvar A) djeluje kao kompetitivni inhibitor, a druga (tvar B) kao nekompetitivni inhibitor.
- ▶ Odredi koja krivulja pripada kojoj tvari i objasni svoj odgovor.

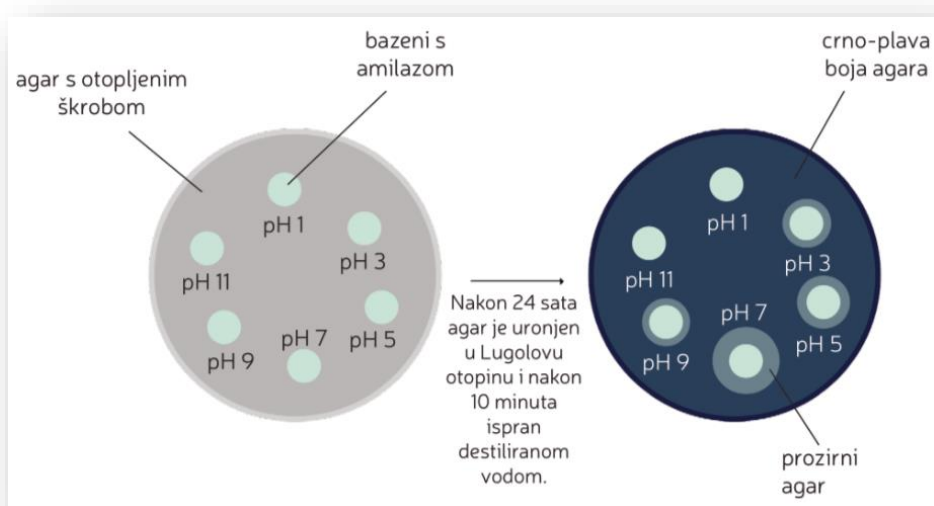


RADNI LISTIĆ → VAŽNOST PROTEINA U ŽIVIM ORGANIZMIMA

PONAVLJANJE

Na nastavi biologije učenici žele istražiti utjecaj pH-vrijednosti okoline na aktivnost enzima amilaze. Pritom će se koristiti pločama agara koje u sebi sadrže otopljeni škrob.

Nakon što se agar ohladio i stvrdnuo, učenici su u njemu s pomoću kružnog bušača napravili šest malih bazena i u svaki stavili jednak volumen amilaze te ga dopunili otopinama pufera različitih pH-vrijednosti. Petrijevke s agarom ostavljene su u inkubatoru na temperaturi od 36°C tijekom 24 sata. Rezultati i metoda istraživanja vidljivi su na slici.



a) Objasni kako djeluje enzim amilaza?

b) Objasni na koji način učenici mogu iskoristiti dobivene rezultate za objašnjenje utjecaja pH vrijednosti okoline na aktivnost enzima amilaze.

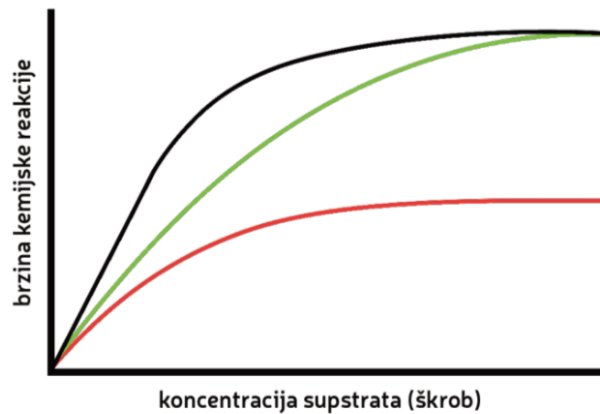
c) Učenici su zaključili da amilaza pokazuje najveću aktivnost pri pH-vrijednosti 7. Međutim, učenici su ubrzali s donošenjem zaključka koji možda i nije znanstveno ispravan. Objasni zašto?

d) Na temelju svog znanja o enzimima i njihovoj strukturi, objasni rezultate dobivene pri vrijednostima pH 1 i pH 11.

e) Odredi barem tri kontrolne varijable u tom istraživanju.

f) Prouči što su inhibitori enzima i kakvi oni mogu biti.

PROMOTRI GRAFIKON:



Tvari A i B inhibitori su enzima amilaze. Jedna od njih (tvar A) djeluje kao kompetitivni inhibitor, a druga (tvar B) kao nekompetitivni inhibitor.

- ▶ Odredi koja krivulja pripada kojoj tvari i objasni svoj odgovor.

RADNI LISTIĆ – EKSPERIMENTALNI DIO

Kako djeluju enzimi?

POSUDE:

- ▶ Drveni stalak
- ▶ 2 x epruvete
- ▶ 2 x kapaljke
- ▶ Ribež
- ▶ 5 x satno staklo

KEMIKALIJE:

- ▶ 5% otopina vodikova peroksida (H_2O_2)
- ▶ Manganov dioksid

OSTALO:

- ▶ Pileća jetra
- ▶ Jabuka
- ▶ Limunov sok
- ▶ Voda

A) Izvedi pokus prema uputama:

- 1.) U dvije epruvete ulij po 5 mL otopine vodikovog peroksida
- 2.) U prvu epruvetu dodaj komadić svježe pileće jetre
- 3.) U drugu epruvetu dodaj kristalić manganova oksida

Zapiši opažanja:

1. Izvdi pokus prema uputama:

- a) Razrežite jabuku na kriške i stavite svaku na jedno satno staklo
- b) Prvu krišku stavi na radijator, drugu u posudicu s vodom, na treću nakapajte limunov sok, četvrtu izribajte ribežom, a petu ostavite bez daljnjeg pokusa

Zapiši opažanja:

Literatura *Izvori za učenike i izvori koje je učitelj koristio za pripremu poučavanja.*

Lukša Ž, Mikulić S, Bendelja D, Krajačić M. (2021) Biologija 3. Udžbenik biologije u trećem razredu gimnazije. Školska knjiga.

Lukša Ž, Mikulić S, Bendelja D, Slatki M, Šafran M. (2021) Biologija 3. Radna bilježnica za biologiju u trećem razredu gimnazija. Školska knjiga.

Dragobratović A, Biliškov N, Habuš A i sur. Kemija 4, digitalni obrazovni sadržaj za četvrti razred opće gimnazije. CARNET. <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/fd4e4aca-de35-49a7-9436-638df9b1c154/kemija-4-1.html> (Pristupljeno: 5.9.2023.)

Refleksija nakon poučavanja *Zabilješke nakon izvedbe nastavnog sata o uspješnosti sa sugestijama za poboljšanje.*

Učenicima je tema vrlo zanimljiva. Uspješno je povezuju sa svakodnevnim životom i shvaćaju rezultate provedenog istraživanja. Učenici uz pomoć nastavnice rješavaju radni list i shvaćaju sve zaključke donesene u ovoj nastavnoj jedinici.