

Procjena genotoksičnog učinka hidrolata vrsta *Veronica officinalis* L. i *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *satuejoides* na stanice raka debelog crijeva (HCT116)

Klarica, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:296255>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Odjel za biologiju

Ivana Klarica

**Procjena genotoksičnog učinka hidrolata vrsta *Veronica officinalis*
L. i *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *satuejoides* na stanice raka
debelog crijeva (HCT116)**

Diplomski rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Odjel za biologiju

Ivana Klarica

**Procjena genotoksičnog učinka hidrolata vrsta *Veronica officinalis*
L. i *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *satuejoides* na stanice raka
debelog crijeva (HCT116)**

Diplomski rad

Split, 2022.

Ovaj rad, izrađen pod vodstvom doc. dr. sc. Željane Fredotović predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Ovaj diplomski rad je dio HrZZ projekta IP-2020-02-8425; Hrvatske vrste roda *Veronica*: fitotaksonomija i biološka aktivnost; CROVeS-PhyBA



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Diplomski rad

PROCJENA GENOTOKSIČNOG UČINKA HIDROLATA VRSTA *Veronica officinalis* L. I
Veronica saturejoides Vis. subsp. *satuejoides* NA STANICE RAKA DEBELOG CRIJEVA
(HCT116)

Ivana Klarica

Vrste roda *Veronica* (hrv. čestoslavice) su višegodišnje, zeljaste biljke s raznolikim staništem diljem Europe i Azije. Broje otprilike 450 vrsta od kojih svega 30 obitava u Hrvatskoj. Zbog ljekovitih svojstava koje duguju visokom sadržaju biološki aktivnih spojeva, čestoslavice se od davnina koriste u tradicionalnoj medicini, a također su i predmet zanimanja brojnih znanstvenika. U ovom istraživanju ispitan je toksični učinak hidrolata dviju vrsta roda *Veronica*, *Veronica officinalis* L. (hrv. ljekovita čestoslavica) i *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *satuejoides* (hrv. vriskolika (vriskova) čestoslavica) na genetički materijal stanica karcinoma debelog crijeva (HCT116). Za procjenu genotoksičnog učinka proveden je standardni *in vitro* alkalni komet test. Dobiveni rezultati pokazali su kako hidrolati navedenih vrsta posjeduju nizak genotoksični učinak na stanice karcinoma debelog crijeva. Primijećena je razlika u genotoksičnoj aktivnosti između vrsta, no utvrđeno je kako je ta razlika statistički zanemariva. Rezultati ovog istraživanja upućuju na mogućnost sigurne primjene hidrolata ovih biljnih vrsta u medicinske i kozmetičke svrhe. Ipak, nužno je provesti daljnja ispitivanja koja će obuhvatiti spektar testova na različitim tipovima stanica, *in vitro* i *in vivo*, s ciljem procjene cjelokupne genotoksičnosti hidrolata i njegovih aktivnih spojeva.

(51 stranica, 12 slika, 2 tablice, 1 graf, 37 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Veronica officinalis*, *Veronica saturejoides* subsp. *satuejoides*, hidrolat, genotoksičnost, HCT116 stanice, komet test

Voditelj: doc. dr. sc. Željana Fredotović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Željana Fredotović

prof. dr. sc. Valerija Dunkić

mag. educ. biol. et chem. Marija Nazlić

Rad prihvaćen: rujan, 2022.

ASSESSMENT OF GENOTOXIC EFFECT OF THE HYDROSOLS FROM SPECIES *Veronica officinalis* L. AND *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *satirejoides* ON COLON CANCER CELLS (HCT116)

Ivana Klarica

The species of the genus *Veronica* are perennial herbaceous plants found throughout Europe and Asia. There are about 450 species, of which only 30 are found in Croatia. Due to their medicinal properties, which are due to the high content of biologically active compounds, this species has been used in traditional medicine since ancient times and are now the subject of interest of many scientists. In this study, the toxic effect of hydrosols of two species of the genus *Veronica*, *Veronica officinalis* L. and *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *satirejoides*, on the genome of colon cancer cells (HCT116) was investigated. A standard alkaline comet assay was performed in vitro to evaluate the genotoxic effect. The obtained results show that the hydrosols of this species have a low genotoxic effect on colon cancer cells. A difference in genotoxic activity was observed between the species, but it was statistically negligible. The results of this study suggest the possibility of safe use of the hydrolates of these plant species for medicinal and cosmetic purposes. Nevertheless, it is necessary to perform further tests on different cell types *in vitro* and *in vivo* to evaluate the overall genotoxicity of the hydrosols and their active compounds.

(51 pages, 12 pictures, 2 tables, 1 graph, 37 references, Original language: Croatian)

Key words: *Veronica officinalis*, *Veronica saturejoides* subsp. *satirejoides*, hydrolate, genotoxicity, HCT116 cells, comet assay

Supervisor: doc. dr. sc. Željana Fredotović

Reviewers: Željana Fredotović, Ph. D, *Assistant professor*

Valerija Dunkić, Ph. D, *Full professor*

Marija Nazlić, *mag. educ. biol. et chem.*

Thesis accepted: September 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Cilj istraživanja.....	2
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Biljke roda <i>Veronica</i>	3
2.1.1. Sistematska pripadnost i vanjske karakteristike vrsta <i>Veronica officinalis</i> i <i>Veronica saturejoides</i>	4
2.1.2. Geografska rasprostranjenost i ekološki uvjeti vrsta <i>Veronica officinalis</i> i <i>Veronica saturejoides</i>	6
2.1.3. Poznati biološki učinci i kemijski sastav	8
2.2. Karcinom	10
2.3. Genotoksičnost	11
2.4. Komet test	13
2.5. Fluorescentna mikroskopija	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Hidrolati vrsta <i>Veronica officinalis</i> . i <i>Veronica saturejoides</i> subsp. <i>satuejoides</i>	17
3.1.2. Stanična linija karcinoma debelog crijeva (HCT116)	17
3.1.3. Kemikalije i laboratorijska oprema	18
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Kultiviranje i propagacija stanica	19
3.2.2. Priprema i tretman stanica	20
3.2.3. Određivanje oštećenja DNK tretiranih stanica komet testom	22
3.2.4. Analiza oštećenja DNK tretiranih stanica na fluorescentnom mikroskopu.....	23
3.2.5. Statistička obrada podataka	24
4. REZULTATI	25
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK	31
7. LITERATURA	32
METODIČKI DIO	35

1. UVOD

Biljke roda *Veronica* od davnina su poznate po svojim ljekovitim svojstvima. Iako se često smatraju korovom, brojna znanstvena istraživanja pokazala su kako su ove biljke važan izvor fitokemijski aktivnih spojeva odgovornih za niz bioloških aktivnosti poput antioksidativnih (Harput i sur., 2010, Mocan i sur., 2015, Lee i sur., 2015, Nazlić i sur., 2021), citotoksičnih (Živković i sur., 2014, Nazlić i sur., 2021) te antimikrobnih (Gründemann i sur., 2012, Mocan i sur., 2015, Nazlić i sur., 2021). Predmet istraživanja ovog diplomskog rada dvije su vrste roda *Veronica*, *Veronica officinalis*, ljekovita biljka često korištena u tradicionalnoj medicini i *Veronica saturejoides* subsp. *satuejoides*, zaštićena endemska biljka centralnog dijela jugozapadnog Balkana. Nazlić i sur. (2021) analizirali su sastav hlapljivih spojeva eteričnog ulja i hidrolata *V. officinalis* i *V. satuejoides* Vis. subsp. *satuejoides* te njihovu biološku aktivnost. Rezultati su pokazali da obje testirane vrste imaju značajan citotoksični učinak na stanične linije karcinoma, međutim genotoksični učinak još uvijek nije ispitivan. Iz navedenog razloga smo u ovom radu testirali potencijalno toksični učinak hidrolata vrsta *V. officinalis* i *V. satuejoides* subsp. *satuejoides* na genetički materijal humanih stanica karcinoma debelog crijeva (HCT116). Genotoksičnost hidrolata analizirana je komet testom, jednom od najraširenijih metoda za određivanje oštećenja DNK. Hidrolati (cvjetne vodice) nastaju kao nusprodukti prilikom ekstrakcije eteričnih ulja, a u novije vrijeme su postali predmet istraživanja brojnih znanstvenika zbog značajnog biološkog potencijala i niže toksičnosti u odnosu na eterična ulja. Ukoliko se potvrdi genotoksični učinak hidrolata testiranih vrsta *Veronica*, potrebno je provesti dodatna ispitivanja sigurnosti primjene navedenih biljaka u tradicionalnoj medicini kao i kozmetičkoj industriji.

1.1. Cilj istraživanja

Ispitati toksični učinak hidrolata vrsta *Veronica officinalis* i *Veronica saturejoides* subsp. *satuejoides* na genetički materijal humanih stanica karcinoma debelog crijeva (HCT116).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biljke roda *Veronica*

Biljke roda *Veronica* (hrv. čestoslavica) pripadaju porodici Plantaginaceae (hrv. trputčevka) te redu Lamiales (hrv. medicolike) (Tablica 1).

Tablica 1. Taksonomija roda *Veronica* (čestoslavica)

ODJELJAK	Spermatophyta (sjemenjače)
PODODJELJAK	Magnoliophytina (kritosjemenjače)
RAZRED	Magnoliatae (dvosupnice)
PODRAZRED	Astreidae
RED	Lamiales (medicolike)
PORODICA	Plantaginaceae (trpučevke)
ROD	<i>Veronica</i> (čestoslavice)

Rod *Veronica* sadrži oko 450 biljnih vrsta, od kojih u Hrvatskoj raste oko 30. Najznačajnije vrste roda *Veronica* su *Veronica officinalis* (ljekovita čestoslavica), *Veronica arvensis* (poljska čestoslavica), *Veronica chamaedrys* (zmijina čestoslavica), *Veronica spicata* (klasasta čestoslavica) i *Veronica persica* (perzijska čestoslavica) (web 1). Čestoslavice su višegodišnje, zeljaste biljke s ljubičasto-plavim ili bijelim sitnim cvjetovima skupljenim u grozdaste cvatove. Ove biljke, visine do 30 cm rastu u Europi i Aziji te imaju vrlo raznoliko stanište; od livada i polja do šuma i planina. Raznolikost staništa čestoslavice duguju svojoj velikoj sposobnosti prilagodbe na tla različite pH vrijednosti i strukture (web 3).

Čestoslavice sadrže brojne kemijske tvari uključujući tanine, amigdalín, eterična ulja, saponine, organske kiseline i druge, a zbog svojih ljekovitih svojstava su se koristile u tradicionalnoj medicini za liječenje respiratornih bolesti, bolesti jetre, slezene, bubrega, žuči,

kožnih bolesti te mnogih drugih (web 3). Poznata je i legenda o pastiru koji je svjedočio čudu cijeljenja rana ozlijeđenog jelena nakon što je on legao na tlo prekriveno čestoslavicama u cvatu te pojeo nekoliko cvjetova (web 2).

Kako su čestoslavice biljke poznate od davnina nije neobično što je njihova povijest ispisana raznim legendama, no unatoč tome ili možda čak zahvaljujući tome danas sve više raste zanimanje znanstvenika o njihovim blagotvornim učincima na zdravlje čovjeka.

2.1.1. Sistematska pripadnost i vanjske karakteristike vrsta *Veronica officinalis* i *Veronica saturejoides*

Sistematska pripadnost vrsta *Veronica officinalis* L. (ljekovita čestoslavica) i *Veronica saturejoides* Vis. (vriskolika ili vriskova čestoslavica) prikazana je u Tablici 2. Temeljem pravilnika o sakupljanju samoniklih biljaka u svrhu prerade, trgovine i drugog prometa, *Veronica officinalis* se smatra zaštićenom biljnom vrstom dok je *Veronica saturejoides* svrstana u strogo zaštićene i endemične biljke u Republici Hrvatskoj.

Tablica 2. Sistematska pripadnost vrsta *Veronica officinalis* L. i *Veronica saturejoides* Vis. (Fabijanić, 2018)

ODJELJAK	Spermatophyta (sjemenjače)
PODODJELJAK	Magnoliophytina (kritosjemenjače)
RAZRED	Magnoliatae (dvosupnice)
PODRAZRED	Astreidae
RED	Lamiales (medicinske)
PORODICA	Plantaginaceae (trpučevke)
ROD	<i>Veronica</i> (čestoslavice)
VRSTA	<i>Veronica officinalis</i> L. (ljekovita čestoslavica) <i>Veronica saturejoides</i> Vis. (vriskolika čestoslavica)

Veronica officinalis L. (Slika 1) je puzava trajnica zeljaste stabljike visine od 10 do 20 cm. Listovi su ovalni, nasuprotno raspoređeni, eliptični i obrasli dlakama. Ima dvospolne cvjetove skupljene u grozdove koji cvatu od lipnja do kolovoza (Forenbacher, 2001). Cvjetovi su svijetloplave do svijetlo ljubičaste boje, ponekad bijele te imaju samo 2 prašnika. Plod je čahura (Šilić, 1988).



Slika 1. *Veronica officinalis* L. (web 4)

Veronica saturejoides (Slika 2) ima 3 podvrste: *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *satuejoides*, *Veronica saturejoides* subsp. *munellensis* i *Veronica saturejoides* subsp. *kellereri*. Ova puzava, višegodišnja biljka ima djelomično odrvenjelu stabljiku visine 10-30 cm. Listovi su nasuprotno raspoređeni, eliptično-lancetasti te su goli ili s vrlo malo dlaka. Listovi pri dnu stabljike formiraju rozetu. Cvjetovi su dvospolni, nepravilni te cvatu od svibnja do srpnja. 6-12 cvjetova skupljeni su u grozdove (Šilić, 1988). Imaju 2 prašnika koji strše iz vjenčića te međusobno srasle plave latice. Plod je obrnuto srolak tobolac (Ljubičić i sur., 2022).



Slika 2. *Veronica saturejoides* Vis. (N Sloth, 2003)

2.1.2. Geografska rasprostranjenost i ekološki uvjeti vrsta *Veronica officinalis* i *Veronica saturejoides*

Veronica officinalis raste u listopadnim šumama (najčešće bukovim), šumskim livadama, gorskim te pretplaninskim područjima (Forenbacher, 2001). Rasprostranjena je širom Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Raste na suhim, kiselim kamenito-pjeskovitim ili ilovastima tlima (Šilić, 1988). U Hrvatskoj je ova vrsta najvećim dijelom rasprostranjena na brdskim i planinskim lancima (Slika 3).



Slika 3. Rasprostranjenost vrste *Veronica officinalis* L. u Hrvatskoj (Nikolić, 2015)

Veronica saturejoides supsp. *saturationoides* rasprostranjena je u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini i Crnoj Gori, subsp. *munellensis* u sjevernoj Albaniji, a subsp. *kellereri* u Bugarskoj. Dakle, u Hrvatskoj pronalazimo samo podvrstu *saturationoides* i to u sklopu ilirsko-dinarskih planinskih rudina Dinare i Kamešnice (Slika 4) (Nikolić i sur., 2015). Raste na mjestima između kamenja koja su zaštićena od vjetra te na ocjeditim tlima (Zrnčić i Zrnčić, 2017).



Slika 4. Rasprostranjenost vrste *Veronica saturejoides* Vis. subsp. *saturejoides* u Hrvatskoj (Nikolić, 2015)

2.1.3. Poznati biološki učinci i kemijski sastav

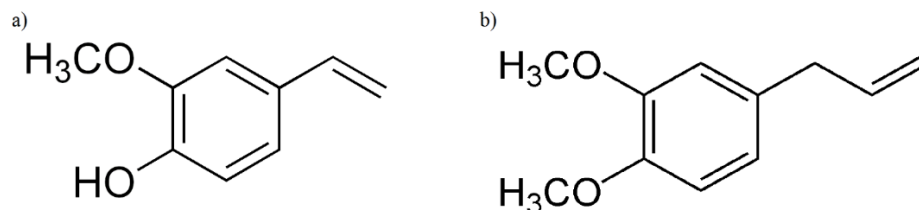
Biljke roda *Veronica* od davnina se koriste u tradicionalnoj medicini zahvaljujući bogatom sadržaju biološki aktivnih komponenti. Poznat je i recept za ublažavanje kašlja s *V. officinalis*, a navedena biljka nalazi se i u popularnim Ricola bombonima koji služe za smirenje nadražnog grla (web 5). Nadzemni dijelovi biljke *V. officinalis* koriste se za liječenje plućnih bolesti i bolesti bubrega, kao diuretici, za smirivanje kašlja, cijeljenje rana, hiperkolesterolemiju (Mocan i sur., 2015). Također, poznato je njezino blagotvorno djelovanje na bolesti jetre, ekceme, ulcere, ugrize zmija i kožne bolesti. Smatrala se čak i univerzalnim lijekom te jednim od sastojaka lijekova protiv kuge (web 3).

Mocan i sur. (2015) ispitali su antimikrobnu aktivnost etanolnih ekstrakata nekoliko vrsta roda *Veronica* među kojima je i *V. officinalis* te došli do zaključka kako ona posjeduje antioksidativna i antibakterijska svojstva. Najjači antibakterijski efekt uočen je na bakterije roda *Listeria* i to *L. monocytogenes* i *L. ivanovii*. Nadalje, Gründemann i sur. (2012) otkrili su kako

ekstrakt *V. officinalis* inhibira proinflamatorne medijatore humanih stanica pluća. Lee i sur. (2015) otkrili su kako etanolni ekstrakt *V. officinalis* posjeduje antioksidativnu aktivnost te *in vitro* sposobnost sinteze prokolagena tipa 1 bez citotoksičnog učinka. Ustanovili su i kako *in vivo* tretman kremom na bazi istog ekstrakta *V. officinalis* ima pozitivan učinak u smanjenju bora.

Vodenom destilacijom nadzemnih djelova dobivaju se eterična ulja i hidrolati s potencijalno ljekovitim svojstvima. Nazlić i sur. (2021) otkrili su kako hidrolati, kao i eterična ulja *V. officinalis* i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides* imaju antifitovirusnu, antiproliferativnu i antioksidativnu aktivnost. Antifitovirusna aktivnost ispitana je na listovima vrste *Datura stramonium*, prethodno zaražene virusom mozaične bolesti duhana (TMV) dok je antiproliferativna aktivnost dokazana na trima humanim staničnim linijama karcinoma: karcinoma grlića maternice (HeLa), karcinoma debelog crijeva (HCT116) i osteokarcoma (U2OS).

Nazlić i sur. (2021) analizirali su i kemijski sastav hlapljivih spojeva eteričnog ulja i hidrolata vrsta *V. officinalis* i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides*. Najzastupljenija skupina spojeva pronađena u oba hidrolata su fenoli (Slika 5); *p*-vinil guaikol (11,59%) u hidrolatu *V. officinalis*, a metil eugenol (23,31%) u hidrolatu *V. saturejoides* subsp. *satuejoides*. Najveći udio hidrolata *V. officinalis* čine β -ionon (10,74%), benzaldehid (9,25%), kariofilen oksid (7,52%) i (*E*)- β -damaskon (6,69%), a *V. saturejoides* subsp. *satuejoides* kariofilen oksid (21,28%), *trans*-1(7),8-*p*-mentadien-2-ol (11,75%) te benzaldehid (8,87%).



Slika 5. Najzastupljeniji fenoli u hidrolatima *V. officinalis*: *p*-vinil guaikol (a) (Edgar181, 2008) i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides*: metil eugenol (b) (Yikrazuul, 2007)

Mocan i sur. (2015) analizirali su fitokemijski sastav njihovih etanolnih ekstrakata. Analiza ekstrakta vrste *V. officinalis* pokazala je visok udio fenola (ferulinska kiselina, quercitrin,

luteolin...), metoksiliranih flavona (hispidulin, eupatorin...) i fitosterola (β -sitosterol, kampesterol i stigmaterol). Smatra se kako visok udio fenolnih komponenti znatno doprinosi ljekovitim učincima navedenih biljaka.

2.2. Karcinom

Kao jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu, karcinomi predstavljaju ozbiljnu prijetnju zdravlju ljudske populacije. Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization) navodi kako je 2020. godine od karcinoma umrlo gotovo 10 milijuna ljudi širom svijeta. Karcinomi koji su uzrokovali najveću smrtnost u svijetu su karcinom pluća, kolorektalni karcinom, karcinom jetre, želuca i dojke. Liječenje karcinoma uvelike ovisi o zahvaćenom području te o tipu karcinoma zbog čega ono obuhvaća više različitih pristupa i procedura. Najčešći načini liječenja karcinoma su kemoterapija i kirurško uklanjanje kancerogenog tkiva, međutim oni nisu uvijek efikasni zbog čega se stručnjaci iz različitih područja djelovanja već dugi niz godina bave otkrivanjem novih postupaka i djelotvornih supstanci za njegovo liječenje te prevenciju (web 6).

Karcinom ili rak je bolest koja nastaje zbog promjena u DNK stanica. Molekularna osnova promjene DNK su mutacije gena te epigenetske promjene. Tako promijenjene stanice rastu, dijele se i opiru homeostazi. Kancerogene stanice posjeduju više mutiranih gena koji se međusobno nadopunjuju i tako doprinose njegovoj progresiji. Ne uzrokuju sve mutacije karcinom te mnoge od njih stanica sama može popraviti mehanizmima popravka DNK, a ukoliko one zakažu aktivira se apoptoza. Poznato je preko 400 mutiranih gena koji utječu na nastanak raka, a jedna kancerogena stanica može imati njih do 80. Svaki tip raka ima posebnu kombinaciju mutiranih gena zbog čega je njegovo liječenje kompleksno. Ukoliko mutiraju geni koji kodiraju faktore popravka DNK povećava se učestalost mutiranih gena u stanici. Općenito, frekvencija mutacija povećava se s dobi te kulminira u dobi od 50.

Stanica sadrži onkogene te tumor-supresorske gene koji ukoliko mutiraju zajednički doprinose progresiji karcinoma. Mutacije najčešće nastaju zbog okolišnih faktora (fizičkih, kemijskih i bioloških) ali mogu biti uzrokovane i genetskim te epigenetskim faktorima (Bešlija i Vrbanec, 2014).

Jedan od čimbenika koji pridonosi nastanku karcinoma je i oksidativno oštećenje DNK. Oksidativno oštećenje DNK nastaje zbog viška ili manjka kisika u stanici. Procijenjeno je kako jedna stanica dnevno pretrpi 2×10^4 oštećenja DNK od čega je veliki postotak uzrokovan reaktivnim kisikovim česticama (eng. reactive oxygen species) (Barzilai i Yamamoto, 2004). Reaktivne kisikove čestice (slobodni radikali), kao što je vodikov peroksid sadrže jedan ili više nesparenih elektrona koji se kontinuirano proizvode u stanici. Stanice posjeduju vlastite mehanizme kojima ih uklanjaju, međutim ukoliko oni zakažu dolazi do pojave oksidativnog stresa. Oksidativni stres uzrokuje oštećenja DNK te mutacije tumor supresorskih gena, a nastaje nerazmjerom produkcije reaktivnih kisikovih čestica i mehanizama antioksidativne obrane. Zbog svega navedenog, antioksidansi, molekule koje sprječavaju oksidaciju i nastanak reaktivnih kisikovih čestica, imaju veliku ulogu u prevenciji razvoja karcinoma (Kang, 2002).

2.3. Genotoksičnost

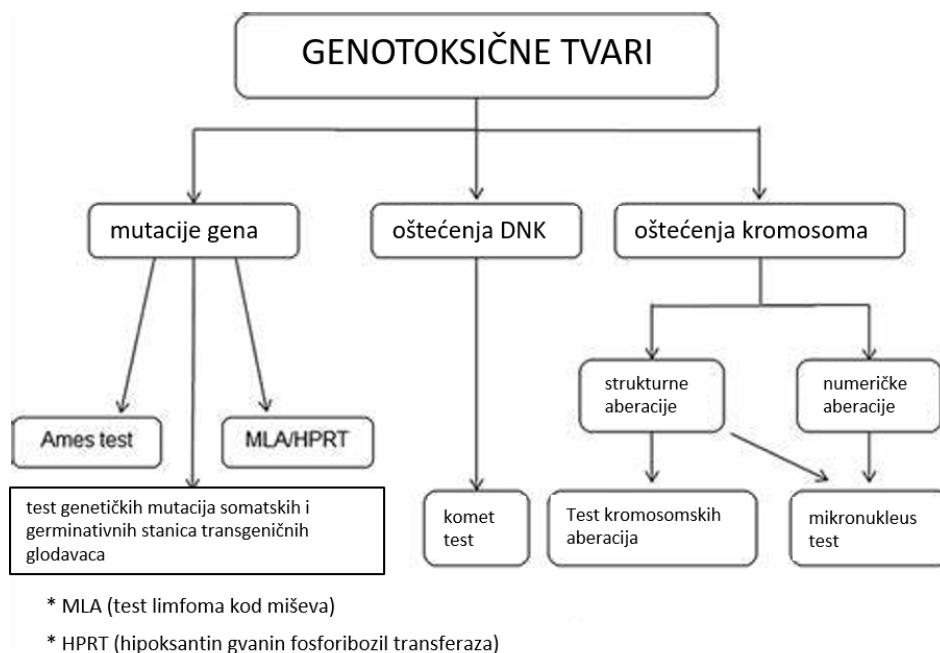
Genotoksičnost označava sposobnost tvari da izazove oštećenje genetičkog materijala (DNK ili kromosome) u stanici. Oštećenje genetičkog materijala može dovesti do mutacija gena, a posljedično i do nastanka karcinoma. Ukoliko oštećenje nastane u germinativnim stanicama (jajna stanica ili spermiji), mutacije se mogu prenositi s majke na dijete (Phillips i Arlt, 2009).

Genotoksične tvari nemaju propisanu sigurnu dozu te se očekuje da predstavljaju rizik po zdravlje čak i u vrlo niskim koncentracijama. Svjetska zdravstvena organizacija navodi kako se kemikalije koje su u isto vrijeme genotoksične i kancerogene ne smiju koristiti u proizvodnji aditiva u hrani, pesticida i veterinarskih lijekova. Za razliku od njih, kemikalije koje u isto vrijeme nisu genotoksične, a kancerogene su, mogu se koristiti u dozama manjim od propisanog prihvatljivog dnevnog unosa (PDU) (Nomhi, 2018).

Genotoksičnost se često može zamijeniti s mutagenošću koja označava sposobnost tvari da trajno promijeni DNK i te promjene prenosi na sljedeću generaciju. I dok genotoksičnost obuhvaća mutagenost, nisu sve genotoksične supstance mutagene jer nastale promjene DNK ne moraju biti nasljedne. Genotoksične supstance mogu direktno ili indirektno oštetiti DNK, međutim točan mehanizam nastanka oštećenja još uvijek nije poznat. Istraživanja genotoksičnosti važna su za

procjenu sigurnosti različitih supstanci i njihovih smjesa (npr. eteričnih ulja i hidrolata) s ciljem prevencije potencijalno negativnih posljedica po ljudsko zdravlje.

Postoji više tehnika i metoda za ispitivanje genotoksičnosti te se za sveobuhvatnu analizu preporuča njihova kombinacija. Najčešće metode za procjenu genotoksičnosti ispitivanih supstanci, uključujući i komet test koji smo koristili u ovom istraživanju, prikazane su na Slici 6.



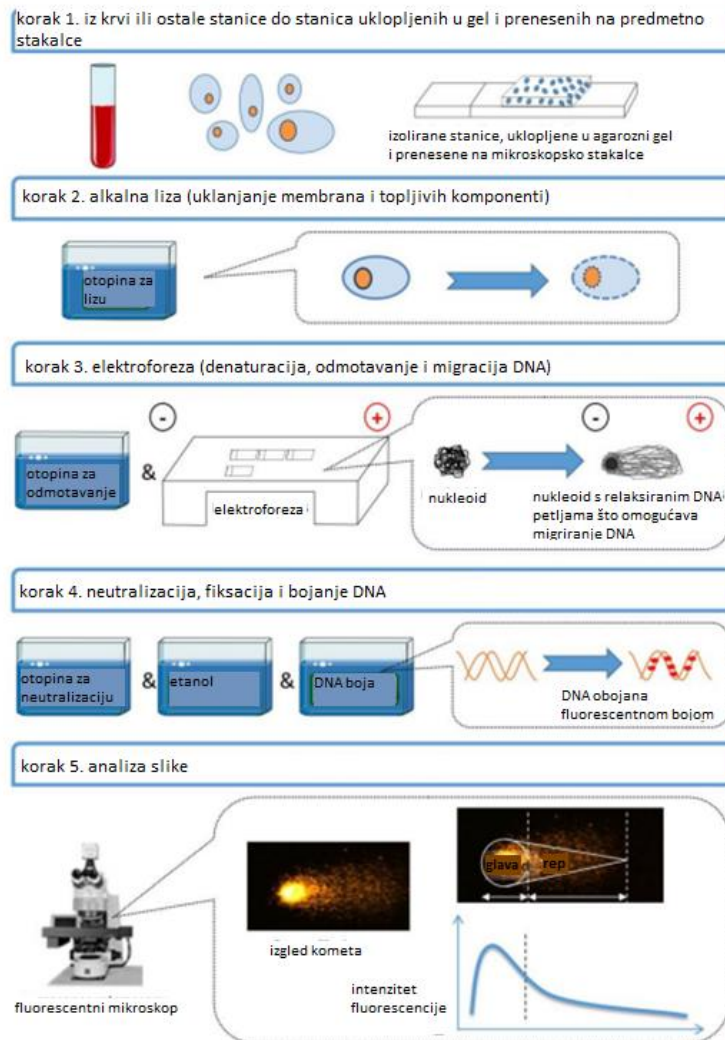
Slika 6. Najčešće metode korištene u ispitivanju genotoksičnih tvari (preuzeto i modificirano iz Ren i sur., 2017)

Iako genotoksične tvari mogu izazvati karcinome, one se mogu koristiti i za njihovo liječenje. Kemoterapija genotoksinima predstavlja novi korak u liječenju karcinoma, a podrazumijeva korištenje dokazano genotoksičnih tvari za izazivanje oštećenja DNK i smrti kancerogenih stanica. Ovakav pristup još uvijek nije usavršen zbog toga što genotoksične tvari utječu i na DNK zdravih stanica (Ren i sur., 2017).

2.4. Komet test

Komet test, odnosno mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu je tehnika za brzo i jednostavno određivanje oštećenja DNK. Komet testom mogu se detektirati jednolančani i dvolančani lomovi DNK, oksidativna oštećenja, alkalno-labilna mjesta, unakrsno vezanje DNK, epigenetske promjene i druga oštećenja (web 7). Analizirati se mogu stanice uzgajane *in vitro* ili *in vivo*. Postoji više vrsta komet testova koji detektiraju različita oštećenja DNK, a u ovom istraživanju koristio se alkalni komet test s ciljem detekcije jednolančanih i dvolančanih lomova. Velika prednost komet testa je i njegova visoka osjetljivost te činjenica da je za analizu potrebno samo 50 do 100 stanica po uzorku (Jarak, 2011).

Komet test provodi se u nekoliko standardiziranih koraka (Slika 7), dok se otopine i kemikalije mogu razlikovati u svom sastavu, koncentraciji i vremenu djelovanja.



Slika 7. postupak pripreme stanica za komet test (web 7)

U ovom eksperimentu koristila su se 2 različita agarozna gela u svrhu fiksacije stanica; agarozna s normalnom točkom taljenja, NMP (eng. normal melting point agarose) i agarozna s nižom točkom taljenja, LMP (eng. low melting point agarose). Ukoliko se za komet test koristi samo NMP agarozna, rezultati će biti lažno pozitivni zato što više talište uzrokuje denaturaciju DNK. S druge strane, ukoliko koristimo samo LMP agarozu, DNK će biti stabilizirana međutim, adhezija gela na stakalce bit će oslabljena te će se on prilikom elektroforeze odlijepiti sa stakalca. Zbog svega navedenog najčešće se koristi kombinacija dvaju gelova tako što se NMP agarozna nanosi prva na predmetno stakalce (web 8). Nakon što se NMP agarozna skruti, preko nje se dodaje mješavina stanica i LMP agaroze.

Nakon fiksacije stanica, stakalca se uranjaju u otopinu za lizu koja uklanja topljive stanične komponente (staničnu membranu, citoplazmu, proteine, histone itd.) ostavljajući ogoljenu DNK molekulu. Preostala DNK se zatim denaturira izrazito alkalnom otopinom ($\text{pH} > 13$) koja razdvaja lance DNK na i oko mjesta lomova. Alkalna otopina koja se koristi u svrhu denaturacije DNK, koristi se i za elektroforezu. Elektroforezom se lanci DNK molekula razdvajaju te negativno nabijena DNK migrira prema anodi. Brzina migracije različitih dijelova DNK ovisi o odsutnosti, odnosno prisutnosti lomova zbog čega izgled DNK nakon elektroforeze podsjeća na komet. Izgled kometa proizlazi iz činjenice da DNK brže putuje ukoliko je razmotana, odnosno ukoliko je na tom mjestu prisutan lom. Zbog svega navedenog za DNK takvog izgleda kažemo da se sastoji od „glave“ (visoko kondenzirana DNK) i „repa“ (relaksirana DNK uslijed prisutnosti lomova) (Bajpayee i sur., 2013).

Nakon elektroforeze, stakalca se ispiru kako bi se alkalna otopina neutralizirala te se nanosi DNK-vezujuća boja. U svrhu ovog istraživanja koristila se DAPI boja koja se vezuje za dvostruku uzvojnica (Collins, 2004) i to za regije bogate adeninom i timinom. Po završetku bojanja, DNK se vizualizira pod fluorescentnim mikroskopom povezanim na računalo. Računalo sadrži odgovarajući program koji omogućuje praćenje različitih parametara od kojih je najvažniji repni moment (eng. tail moment).

2.5. Fluorescentna mikroskopija

Fluorescentni mikroskop funkcionira slično kao svjetlosni uz nekoliko dodataka koje povećavaju njegovu sposobnost razlučivanja. I dok svjetlosni mikroskop koristi snop vidljivog svjetla (400-700 nm), fluorescentni mikroskop koristi svjetlost jačeg intenziteta što omogućava pobuđivanje fluorescentnih boja u uzorku. Fluorescentni mikroskop koristi se za vizualizaciju staničnih organela te njihovih trodimenzionalnih karakteristika zbog čega je on često korišten alat u biološkim i biomedicinskim laboratorijima (web 9).

Za detaljnije shvaćanje principa fluorescentne mikroskopije potrebno je vratiti se u same početke otkrića fluorescencije. 1852. godine Sir George Gabriel Stokes po prvi je put opisao fenomen fluorescencije kao sposobnost organske ili anorganske tvari da apsorbira i posljedično re-

emitira svjetlost. Kako se dio energije u tom procesu gubi, emitirana svjetlost manje je energije nego apsorbirana. Također, svjetlost manje energije ima veću valnu duljinu od svjetlosti veće energije. Ovaj pomak u valnoj duljini naziva se Stokesov pomak, a tvari koje fluorescenciraju fluorofore ili fluorokromi. Zbog svojeg karakterističnog spektra apsorpcije i emisije, fluorofore se koristi kao boje u tehnikama fluorescentne mikroskopije. U ovom istraživanju kao fluorescentna boja koristi se DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol).

Cilj fluorescentne mikroskopije je odvojiti snop apsorbiranog i emitiranog svjetla kako bi samo emitirano svjetlo došlo do detektora. Ovo se postiže korištenjem različitih optičkih filtera (ekscitacijski i emisijski filter). Emitiranu svjetlost možemo vidjeti okom ili pomoću računala (Wang i Lai, 2021).

Postoji više vrsta fluorescentnog mikroskopa (fluorescentni mikroskop s unutarnjim odrazom (TIRF) i konfokalni mikroskop), a u provedenom istraživanju korišten je epifluorescentni mikroskop. Epifluorescentni mikroskop posebno je koristan u vizualizaciji uzoraka debljih od $10\mu\text{m}$ zbog zrake svjetlosti koja dopire duboko u uzorak. Nedostaci ove tehnike su razmjerno visok "background noise" odnosno pozadinska buka, smanjena sposobnost lokalizacije fluorofora te nemogućnost trodimenzionalne vizualizacije uzorka (web 10).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Hidrolati vrsta *Veronica officinalis* i *Veronica saturejoides* subsp. *satuejoides*

Biljni materijal korišten u ovom istraživanju sakupljen je na planinskim masivima Kamešnice. Oba hidrolata su dobivena postupkom vodene destilacije eteričnog ulja biljnih vrsta *Veronica officinalis* L. i *Veronica saturejoides* subsp. *satuejoides*. Postupak je proveden pomoću Clevenger aparature tako što se prethodno osušen biljni materijal destilirao. Nusprodukt vodene destilacije, odnosno hidrolat se skupljao te je nakon završene destilacije pohranjen u hladnjak na +4 °C (Nazlić i sur., 2021).

3.1.2. Stanična linija karcinoma debelog crijeva (HCT116)

Genotoksični učinak hidrolata izoliranih iz vrsta *Veronica officinalis* L. i *Veronica saturejoides* subsp. *satuejoides* ispitan je na humanim stanicama karcinoma debelog crijeva (HCT116). Korištene stanice su donacija prof. Janoša Terzića s Medicinskog fakulteta u Splitu.

HCT116 nastale su mutacijama gena odraslog muškarca te su pogodne za *in vivo* i *in vitro* istraživanja. *In vivo* implantacija stanica u imunokompromitirane miševе dovodi do formiranja tumora i metastaza. *In vitro* stanice rastu s vremenom udvostručavanja od 18 sati (web 11). U genomu stanične linije HCT116 dosad je otkriveno 4082 mutacija, uključujući mutacije VPS13A, PCDHA3, RINT1, SLC25A29 i LRRK2 gena (web 12), te mutacije kodona 13 ras proto-onkogenā (KRAS) što dovodi do nastanka i progresije tumora (web 13).

3.1.3. Kemikalije i laboratorijska oprema

- DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) hranjivi medij za rast stanica
- Penicilin/streptomycin antibiotik
- FBS (Fetal Bovine Serum)
- Trypsin
- H₂O₂
- NMP agaroz (normal melting point)
- LMP agaroz (low melting point)
- Otopina za lizu (pH≈10) (zbog potpisanog ugovora o tajnosti ne smije se navoditi sastav otopine)
- Otopina za denaturaciju i elektroforezu (pH≈13) (zbog potpisanog ugovora o tajnosti ne smije se navoditi sastav otopine)
- 0.4 M Tris-Cl
- Destilirana voda
- 70% i 96% etanol
- DAPI (4,6-diamidin-2-fenilindol)
- Pokrovna i predmetna stakla
- Mikropipete
- Vakum sisaljka
- Invertni mikroskop
- Laminar
- Inkubator
- Hladnjak
- Ploče za uzgoj staničnih kultura sa 6 jažica
- Mikrovalna pećnica
- Automatizirani brojač stanica
- Aparatura za elektroforezu
- Fluorescentni mikroskop
- Lucia komet software

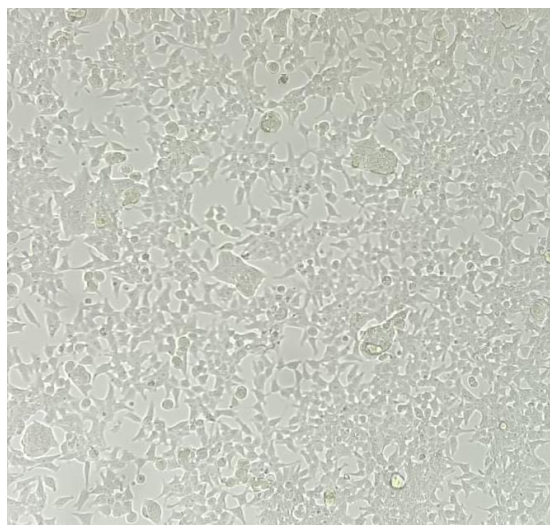
3.2. Metode

3.2.1. Kultiviranje i propagacija stanica

HCT116 stanice su nakon odmrzavanja uzgojene u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO₂, u DMEM hranjivom mediju. U svrhu sprječavanja kontaminacije neželjenim bakterijama u bocu s DMEM dodano je 5 mL penicilin/streptomycin antibiotika te 50 mL FBS-a. FBS je fetalni goveđi serum koji sadrži sve važne čimbenike za rast i proliferaciju stanica hormone, faktore rasta, aminokiseline, šećere i lipide. Prije samog rasađivanja stanica, DMEM medij i 0,25% otopinu tripsina potrebno je zagrijati u inkubatoru barem 30 minuta na 37°C kako različita temperatura otopina ne bi negativno utjecala na metabolizam i staničnu aktivnost HCT116 stanica. Također, prije rasađivanja potrebno je posudu s kulturom stanica pregledati pod invertnim mikroskopom.

Ukoliko je površina posude 80-90% konfluentna (Slika 8) potrebno ju je rasaditi prateći sljedeće korake:

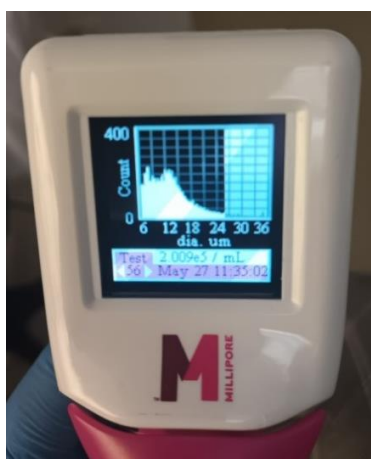
1. Odsisati postojeći medij sterilnom vakuum sisaljkom
2. U novu posudu za uzgoj stanica dodati 8 mL svježeg DMEM medija
3. S 2 mL 0.25% otopine tripsina pipetom lagano “odljepiti” stanice s površine posude. Opisani postupak potrebno je ponavljati sve dok se sve stanice nisu “odljepile”
4. U posudu s tripsinom i stanicama dodati 8 mL DMEM medija kako bi se tripsin neutralizirao te sve skupa još malo resuspendirati kao u koraku 3
5. Usisati 2 mL pripremljenih stanica te ih dokapavanjem nasaditi u posudu sa svježim DMEM medijem pripremljenim u koraku 2. Medij i stanice je po završetku rasađivanja potrebno lagano promiješati kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile po posudi.
6. Pod invertnim mikroskopom ponovno pogledati stanice kako bi smo bili sigurni da je optimalna koncentracija nasadena na ploču. Ukoliko su stanice male i okrugle te “plivaju” potrebno ih je pohraniti u inkubator 48 sati na 37 °C i 5% CO₂.



Slika 8. Stanice karcinoma debelog crijeva prikazane pod invertnim mikroskopom nakon 48 sati rasta

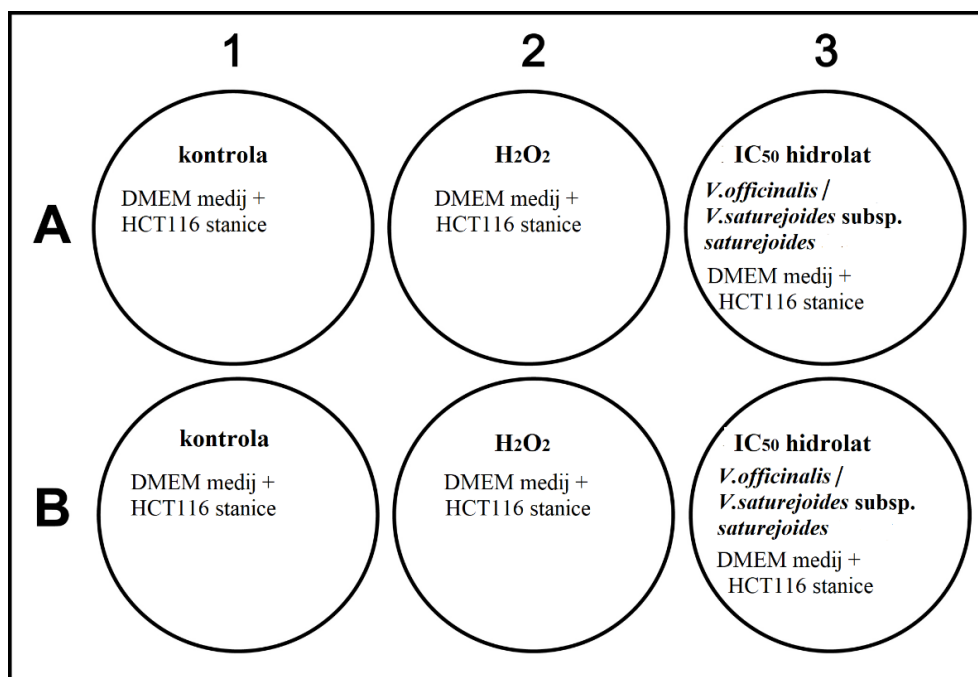
3.2.2. Priprema i tretman stanica

Za potrebe eksperimenta, stanice su se uzgajale i tretirale u ploči za stanične kulture s 6 jažica. U svaku jažicu dodano je 1×10^5 stanica. Točan broj stanica određen je automatiziranim brojačem stanica (Scepter 3.0 Handheld Cell Counter, Millipore) (Slika 9) nakon čega se potrebna koncentracija stanica pripremala razrjeđivanjem s DMEM medijem.



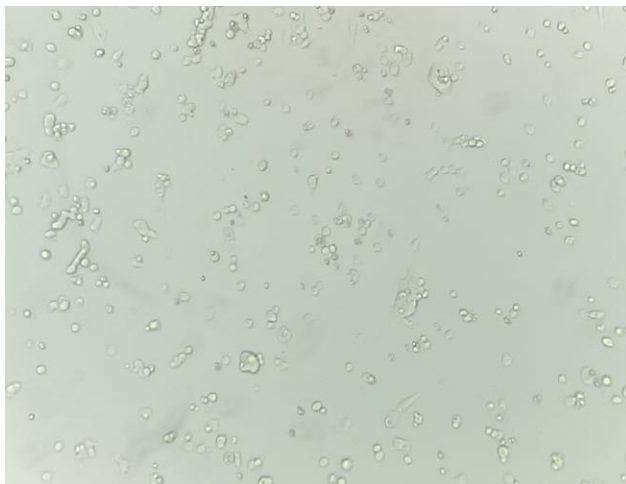
Slika 9. Automatizirani brojač stanica (prikazana vrijednost broja stanica je po mL)

Za procjenu genotoksičnog učinka hidrolata vrsta *V. officinalis* L. i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides* stanice su tretirane prema shemi prikazanoj na Slici 10.



Slika 10. Shematski prikaz tretmana HCT116 stanica provedenog za procjenu genotoksičnog učinka hidrolata dviju vrsta *Veronica*. Napravljene su po dvije replike za svaki tretman hidrolata (jedna za hidrolat *V. officinalis*, a drugi za *V. saturejoides* subsp. *satuejoides*) te pozitivnu i negativnu kontrolu. Eksperiment je ponovljen tri puta.

Stanice su nasadene na mikrotitarsku ploču sa 6 jažica u hranjivom DMEM mediju u prisutnosti IC₅₀ koncentracija hidrolata vrste *V. officinalis* L. i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides* (Slika 11) (IC₅₀ koncentracije prethodno su određene i objavljene u radu Nazlić i sur., 2021.). Netretirane stanice služile su kao negativna kontrola. Stanice tretirane vodikovim peroksidom poslužile su kao pozitivna kontrola koja je trebala pokazati značajnu genotoksičnost. Napravljene su po dvije replike svake koncentracije hidrolata te pozitivne i negativne kontrole. Stanice su potom inkubirane 48 sati na 37°C i 5% CO₂.



Slika 11. HCT116 stanice nakon tretmana hidrolatima prikazane pod invertnim mikroskopom

Nakon inkubacije stanice su isprane neutralnim fosfatnim puferom (PBS), tripsinizirane te centrifugirane i korištene u komet testu. Izuzetak su stanice pozitivne kontrole koje su nakon centrifugiranja tretirane 0.1 mM otopinom vodikova peroksida 30 minuta na +4°C nakon čega su podvrgnute komet testu.

3.2.3. Određivanje oštećenja DNK tretiranih stanica komet testom

U ovom istraživanju, komet test je proveden prateći sljedeće korake:

1. 1% NMP agarozu kuhana je u mikrovalnoj pećnici (nekoliko ciklusa vrenja) te je u tankom sloju nanosena na predmetna stakalca. Ovako pripremljena stakalca ostavljena su da se posuše preko noći.

Iduće korake bilo je potrebno provoditi na temperaturi +4 °C i u mraku kako ne bi izazvali dodatne lomove DNK.

2. 0.5% LMP agaroz kuhana je u mikrovalnoj pećnici (nekoliko ciklusa vrenja) te je 100 μ L dodano u svaku epicu s uzorcima. Uzorci i gel lagano su promiješani da se sadržaj homogenizira, nanese na predmetno stakalce premazano s NMP agarozom te prekriveni pokrovnim stakalcem. Ovako pripremljeni uzorci ostavljeni su 6-8 minuta na ledu kako bi se gel polimerizirao. Cijeli postupak bilo je potrebno izvoditi brzo kako se gel ne bi polimerizirao prije nanošenja stanica na predmetno stakalce.
3. Nakon što se gel polimerizirao, lagano je skinuto pokrovno stakalce te su uzorci stavljeni u uspravni košić s otopinom za lizu. Uzorci su preko noći pohranjeni na temperaturi od +4°C.
4. Nakon završene lize stanica, uzorci su stavljeni 20 minuta u kadicu za elektroforezu s otopinom za denaturaciju i elektroforezu.
5. Nakon 20 minuta u istom puferu provedena je alkalna elektroforeza na 25 V i 300 mA (1 V po 1 cm dužine kadice) kroz 20 minuta.
6. Po završetku elektroforeze stakalca su neutralizirana u hladnom 0.4 M Tri-Cl puferu 2 puta po 5 minuta, zatim u hladnoj destiliranoj vodi te se naposljetku dehidrirana 70% i 96% etanolom.
7. Stakalca s uzorcima osušena su na zraku te obojana fluorescentnom DAPI bojom.

3.2.4. Analiza oštećenja DNK tretiranih stanica na fluorescentnom mikroskopu

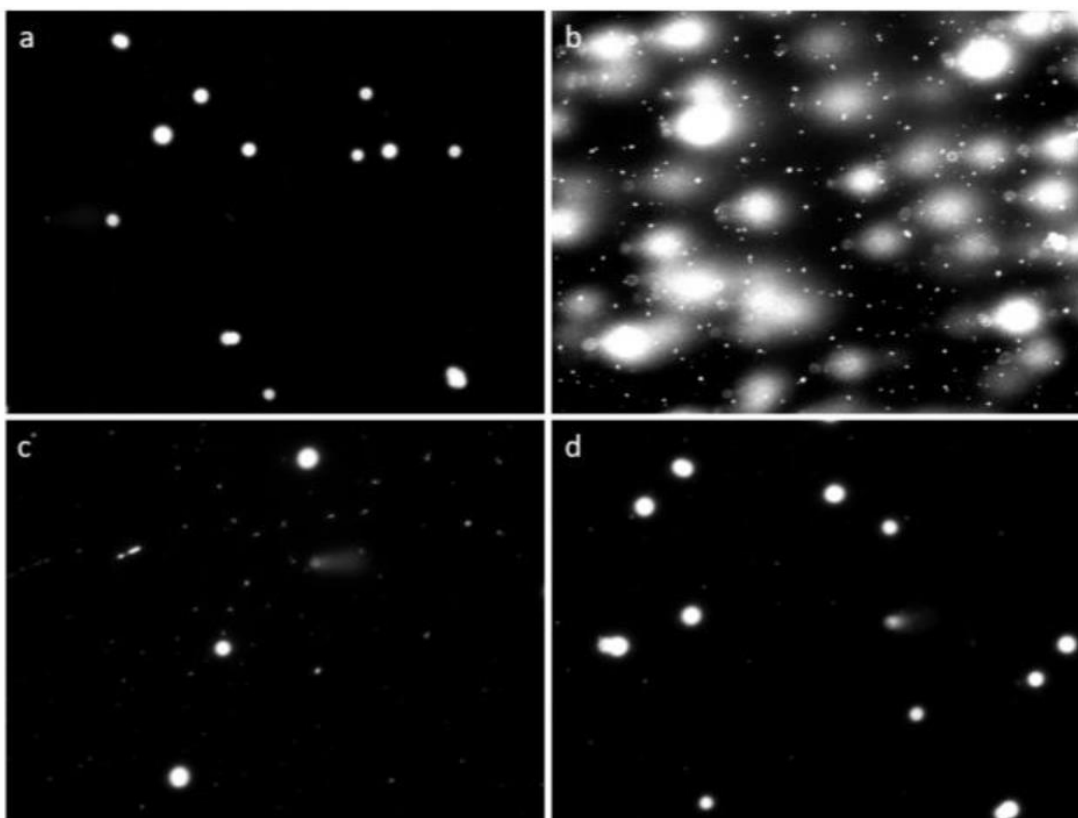
Preparati su analizirani pod epifluorescentnim mikroskopom (Zeiss Axioimager M1 epifluorescence microscope with high-resolution CCD camera, Vienna, Austria) s filterom (ekscitacija na valnoj duljini od 358 nm i emisija na valnoj duljini od 461 nm). Analizirano je 100 nasumično odabranih stanica po uzorku uz pomoć računalnog programa LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, s.r.o., Praha, Czech Republic).

3.2.5. Statistička obrada podataka

Rezultati komet testa dobiveni su analizom pomoću LUCIA Comet Assay programa. Za određivanje genotoksičnog učinka analizirana su dva parametra: postotak (intenzitet) glave i repa kometa iz čega je izračunat repni moment. Dobiveni podaci izraženi su kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom. Tablica i graf oštećenja DNK u HCT116 stanicama napravljeni su u Microsoft Excel programu.

4. REZULTATI

Oštećenje DNK u HCT116 stanicama analizirano je komet testom za IC₅₀ koncentraciju hidrolata vrsta *V. officinalis* i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides* nakon 48 sati izloženosti. Oštećenje DNK izraženo je kao repni moment kometa koji predstavlja umnožak dužine repa i % DNK u repu. Preparati su promatrani pomoću epifluorescentnog mikroskopa. Usporedbom izgleda stanica uočeno je kako uzorci tretirani hidrolatima *V.officinalis* i *V.satuejoides* subsp. *satuejoides* nemaju značajno oštećenje DNK što je vidljivo po tome što većina stanica ima cjelovitu DNK prisutnu u glavi kometa baš kao i netretirani uzorak, odnosno negativna kontrola (Slika 12a, c i d). Uzorak tretiran vodikovim peroksidom (pozitivna kontrola) pokazao je značajno oštećenje DNK u gotovo svim analiziranim stanicama (Slika 12b).



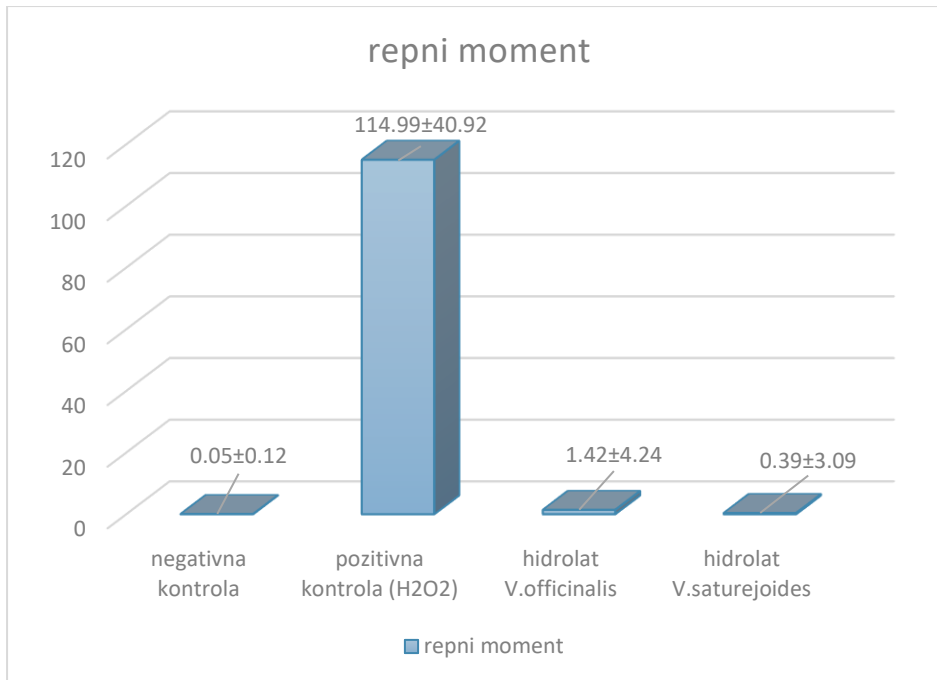
Slika 12. Prikaz HCT116 stanica pod epifluorescentnim mikroskopom nakon komet testa: negativna kontrola (netretirane stanice) (a); pozitivna kontrola (stanice tretirane 0.1 mM vodikovim peroksidom) (b); stanice tretirane IC₅₀ koncentracijom hidrolata *V. officinalis* L. (c) i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides* (d)

Rezultati dobiveni nakon analize nasumično odabranih 100 stanica svakog uzorka prikazani su u Tablici 3. Iz Tablice 3 vidljivo je kako netretirane stanice imaju preko 90% DNK u glavi kometa, a vrijednost repnog momenta je svega 0,05%. Slično možemo uočiti i kod stanica tretiranih hidrolatima *V.officinalis* i *V.saturejeoides* subsp. *saturejeoides*. Iznimno niske vrijednosti postotka DNK u repu i repnog momenta (1,46% i 0,39%) upućuju na nisku genotoksičnost oba hidrolata. Usporedbom repnog momenta stanica tretiranih hidrolatom *V. officinalis* s onima tretiranim hidrolatom *V.saturejeoides* subsp. *saturejeoides* vidljivo je kako nešto manji genotoksični učinak ima hidrolat *V.saturejeoides* subsp. *saturejeoides*. Iako se repni momenti stanica tretiranih hidrolatima razlikuju, ta razlika je vrlo mala, a time i statistički zanemariva.

Tablica 3. Postotak DNK u glavi i repu te repni moment s pripadajućim standardnim devijacijama. Podaci su dobiveni komet testom u HCT116 staničnoj liniji kod netretiranih stanica (negativna kontrola), stanica tretiranih 0.1 mM H₂O₂ (pozitivna kontrola) te stanica tretiranih hidrolatom *V.officinalis* i *V.saturejeoides* subsp. *saturejeoides*.

	postotak DNK u glavi (%)	postotak DNK u repu (%)	repni moment
negativna kontrola	97.97 ± 2.62	2.03 ± 2.62	0.05 ± 0.12
pozitivna kontrola (H₂O₂)	4.77 ± 8.56	94.23 ± 12.76	114.99 ± 40.92
hidrolat <i>V. officinalis</i>	92.53 ± 11.73	7.47 ± 11.73	1.42 ± 4.24
hidrolat <i>V. saturejeoides</i> subsp. <i>saturejeoides</i>	98.54 ± 6.69	1.46 ± 6.69	0.39 ± 3.09

Za razliku od negativne kontrole i tretmana hidrolatima koji ne pokazuju genotoksični učinak, tretman vodikovim peroksidom uvelike je oštetio DNK tretiranih stanica (graf 1).



Graf 1. Oštećenje DNK u HCT116 stanicama prikazano kao repni moment (%) kod netretiranih stanica (negativna kontrola), stanica tretiranih vodikovim peroksidom (pozitivna kontrola) te stanica tretiranih IC₅₀ koncentracijom hidrolata *V.officinalis* i *V.saturejoides* subsp. *saturejoides*.

5. RASPRAVA

Značajna upotreba ljekovitih vrsta roda *Veronica* u tradicionalnoj medicini dovela je do povećanog interesa znanstvenika za istraživanje njihovih bioloških aktivnosti. Procjena učinkovitosti i sigurnosti korištenja medicinskih biljaka trebala bi se temeljiti na znanstvenim dokazima. Jedna od metoda koja ispituje mogući toksični efekt medicinskih biljaka, a time i učinkovitost i sigurnost korištenja je svakako i test procjene genotoksične aktivnosti. Kratkotrajni testovi genotoksičnosti obično se koriste za utvrđivanje mutagenog i kancerogenog potencijala. S obzirom na učestalu upotrebu različitih pripravaka vrsta *V. officinalis* i *V. saturejoides* ssp. *satirejoides* u tradicionalnoj medicini kao i nedostatka dokaza o potencijalnoj toksičnosti njihovih aktivnih spojeva, odlučili smo provesti istraživanje procjene učinka njihovih hidrolata na genom stanica karcinoma debelog crijeva metodom alkalnog komet testa. Komet test je našao široku primjenu u svijetu kao jedan od vodećih testova pri procjeni genotoksičnosti, a velika prednost je njegova visoka osjetljivost i mogućnost korištenja na različitim vrstama stanica. Interakcija između reaktivnih spojeva i DNK molekule jedan je od glavnih puteva koji vode do oštećenja molekule DNK u vidu formiranja jedno- ili dvolančanih lomova koji se mogu detektirati ovim testom.

Nazlić i sur. (2021) identificirali su glavne biološki aktivne spojeve te potvrdili citotoksični učinak hidrolata vrsta *Veronica officinalis* i *Veronica saturejoide* subsp. *satirejoides*, ali njihova potencijalna genotoksična aktivnost do danas nije ispitana. Autori su u provedenom istraživanju utvrdili kako hidrolati navedenih vrsta imaju sposobnost inhibicije rasta triju staničnih linija karcinoma, a najveću aktivnost pokazale su upravo na staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva koja je zbog toga odabrana za ovo istraživanje.

U ovom diplomskom radu istraživanje je provedeno na način da su stanice tretirane hidrolatima i to u koncentraciji koja se poklapa s njihovom IC_{50} vrijednošću prethodno određenom u istraživanju Nazlić i sur. (2021). Osim tretmana hidrolatima, stanice su se tretirale vodikovim peroksidom, poznatim oksidativnim genotoksikantom koji je služio kao pozitivna kontrola, dok su netretirane stanice predstavljale negativnu kontrolu. Po završetku tretmana proveden je komet test s ciljem provjere genotoksične aktivnosti hidrolata. Rezultati istraživanja pokazali su kako hidrolati navedenih biljaka posjeduju vrlo nizak genotoksični učinak na HCT116 stanice. Usporedivši rezultate hidrolata dviju vrsta može se zaključiti kako neznatno veći genotoksični učinak posjeduje

V. officinalis. Iako se genotoksični učinak hidrolata dviju vrsta razlikuje, on je toliko malen te ga možemo zanemariti. Nizak genotoksični efekt možemo dovesti u vezu s mogućim antikancerogenim i antimutagenim svojstvima što je potvrđeno nizom istraživanja. Živković i sur. (2014) su dokazali kako metanolni ekstrakt vrste *Veronica urticifolia* posjeduje citotoksični i antimutageni efekt. Citotoksični učinak *in vivo* dokazan je smanjenjem broja stanica Ehrlichovog karcinoma kod miševa, dok je antimutageni efekt dokazan na bakteriji *Salmonella typhimurium*. Nadalje, istraživanje Aşkin Çelik i Aslantürka (2006) pokazalo je kako vodeni ekstrakt vrste *Plantago lanceolata* posjeduje antimitotički i antigenotoksični efekt na meristemske stanice vrste *Allium cepa* oštećene vodikovim peroksidom. Ova istraživanja ukazuju na to kako bi i hidrolati vrsta *V. officinalis* i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides* mogli posjedovati antimutageni i antikancerogeni potencijal, naročito zato što je brojnim istraživanjima utvrđeno kako biljke ovog roda posjeduju značajnu antioksidativnu aktivnost (Harput i sur., 2010, Mocan i sur., 2015, Nazlić i sur., 2021). S obzirom da nastanak karcinoma može biti uzrokovan oksidativnim stresom, odnosno prekomjernom količinom reaktivnih kisikovih čestica, prisutnost antioksidansa mogla bi imati ulogu u njegovoj prevenciji. Brojna istraživanja provedena su s ciljem utvrđivanja uloge antioksidansa u prevenciji karcinoma. Istraživanja su pokazala oprečne rezultate, međutim dokazano je kako antioksidansi poput selena, vitamina E, karotena, flavonoida i resveratrola imaju svojstva slična kemoterapeuticima. Iako antioksidansi imaju pozitivne učinke na organizam, potrebno je provesti daljnja klinička ispitivanja kako bi se utvrdila njihova točna uloga u prevenciji karcinoma (Bennett i sur., 2012).

Harput i sur. (2010) ispitivali su antioksidativnu aktivnost nekoliko biljaka roda *Veronica*. Rezultati analize pokazali su kako sve vrste posjeduju antioksidativni učinak, a najveću aktivnost imao je vodeni ekstrakt *V. officinalis*. Rezultati su u korelaciji s istraživanjem Mocan i sur. (2015) koji su također dokazali visoku antioksidativnu aktivnost *V. officinalis*. Nadalje su dokazali i kako je antioksidativna aktivnost vrsta *V. officinalis*, *V. orchidea* i *V. teucrium* proporcionalna njihovom fenolnom sastavu. Nazlić i sur. (2021) također su ispitivali *in vitro* antioksidativnu aktivnost vrste *V. officinalis* te po prvi put i *V. saturejoides* subsp. *satuejoides*. Rezultati analize pokazali su kako eterična ulja kao i hidrolati navedenih biljaka imaju značajnu antioksidativnu aktivnost. Navedena otkrića antioksidativne aktivnosti ovih biljaka mogla bi objasniti nizak genotoksični učinak dokazan u ovom istraživanju. Naime, antioksidativna aktivnost jedan je od čimbenika koji pridonosi smanjenju genotoksičnog učinka s obzirom da oštećenja DNK mogu nastati kao

posljedica oksidativnog stresa. U prilog tome ide istraživanje Wan-Ibrahim i sur. (2010) koji su ispitali povezanost antigenotoksičnosti i antioksidativne aktivnosti hidrolata 20 malezijskih jestivih biljnih vrsta na humanim limfocitima. Rezultati su pokazali kako hidrolati s umjerenom antioksidativnom aktivnošću uzrokuju vrlo mala ili nikakva oštećenja DNK.

Niska genotoksičnost hidrolata ispitivanih vrsta roda *Veronica* na HCT116 stanice mogla bi značiti i kako oni nisu genotoksični za zdrave stanice, no to tek treba potvrditi budućim istraživanjima. Rezultati ovog rada ukazuju na mogućnost sigurne primjene hidrolata testiranih vrsta *Veronica* u medicinske i kozmetičke svrhe, međutim potrebna su detaljnija istraživanja na ovom području, naročito zbog toga što se sveobuhvatna genotoksičnost ne može analizirati samo jednim testom. Također, važno je provesti *in vivo* ispitivanja kako bi se utvrdio raspon koncentracija ovih biljnih produkata za sigurnu i učinkovitu upotrebu.

6. ZAKLJUČAK

- Hidrolati vrsta *Veronica officinalis* i *Veronica saturejoides* subsp. *satuejoides* posjeduju nizak genotoksični učinak na stanice karcinoma debelog crijeva (HCT116).
- Veći genotoksični učinak utvrđen je kod vrste *Veronica officinalis*, međutim ta razlika je statistički zanemariva.

7. LITERATURA

1. Aşkin Çelik T., Aslantürk Ö.S. (2006). Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. *Biologia* 61: 693–697 .
2. Bajpayee M., Kumar A., Dhawan A. (2013). The comet assay: assessment of in vitro and in vivo DNA damage. U: Dhawan A., Bajpayee M. (ur.) *Genotoxicity assessment: methods in molecular biology*. Totowa, Humana Press, 325-345.
3. Barzilai A., Yamamoto K.-I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair* 3(8-9): 1109–1115.
4. Bennett L. L., Rojas S., Seefeldt T. (2012). Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of experimental and clinical medicine* 4(4): 215-222.
5. Bešlija S., Vrbanc D. (2014). *Medicinska/internistička onkologija*, Medicinski fakultet: Udruženje onkologa Bosne i Hercegovine, Sarajevo.
6. Collins A. R., (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology* 26(3): 249-61.
7. Forenbacher S. (2001). *Velebit i njegov biljni svijet: II. obnovljeno i dopunjeno izdanje*. Školska Knjiga, Zagreb.
8. Gründemann C., Garcia-Käufer M., Sauer B., Stangenberg E., Könczöl M., Merfort I., Zehl M., Huber R. (2013). Traditionally used *Veronica officinalis* inhibits proinflammatory mediators via the NF- κ B signalling pathway in a human lung cell line. *Journal of ethnopharmacology* 145(1): 118–126.
9. Harput U. S., Genç Y., Khan N., Saracoglu I. (2010). Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Records of Natural Products* 5(2): 100-107.
10. Jarak, M. (2011). *Metode za procjenu genotoksičnosti*. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
11. Kang D.-H. (2002). Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clinical issues* 13(4): 540–549.
12. Lee H., Ghimeray A., Yim J., Chang M. (2015). Antioxidant, collagen synthesis activity in vitro and clinical test on anti-wrinkle activity of formulated cream containing *Veronica officinalis* extract. *Journal of cosmetics, Dermatological sciences and applications* 5(1): 45-51.

13. Ljubičić I., bogdanović S., Britvec M., Dujmović Purgar D., Vitasović Kosić I., Jelić M. (2022). Flora Dinare: 100 značajnih svojti. Spiritoso, Zagreb.
14. Mocan A., Vodnar DC., Vlase L., Crişan O., Gheldiu AM., Crişan G. (2015). Phytochemical characterization of *Veronica officinalis* L., *V. teucrium* L. and *V. orchidea* Crantz from Romania and their antioxidant and antimicrobial properties. International journal of molecular sciences 16(9): 21109-21127
15. Nazlić M., Fredotović Ž., Vuko E., Fabijanić L., Kremer D., Stabentheiner E., Ruščić M., Dunkić V. (2021). Wild species *Veronica officinalis* L. and *Veronica saturejoides* Vis. ssp. *satuejoides*-biological potential of free volatiles. Horticulturae 7(9): 295.
16. Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. (2015). Endemi u hrvatskoj flori. Alfa, Zagreb.
17. Nohmi T. (2018). Thresholds of Genotoxic and Non-Genotoxic Carcinogens, Toxicological Research 34(4): 281-290.
18. Phillips D. H., Arlt V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. U: Luch A. (ur.) Experientia Supplementum. Basel, Birkhäuser Basel, 87–110.
19. Ren N., Atyah M., Chen W.-Y., Zhou C.-H. (2017). The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. Journal of Translational Medicine 15: 110.
20. Šilić Č. (1988). Endemične biljke: 164 fotografije u koloru, 1647 crteža u crno-bijeloj tehnici. "Svjetlost": OUUR " Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
21. Šilić Č. (1988). Šumske zeljaste biljke: 190 fotografija u koloru, 1200 crteža u crno-bijeloj tehnici. "Svjetlost": OUUR " Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
22. Wang X., Lai Y. (2021). Three basic types of fluorescence microscopy and recent improvement. E3S Web of Conferences 290(01031)
23. Wan-Ibrahim W.I., Sidik K., Kuppusamy U.R. (2010). A high antioxidant level in edible plants is associated with genotoxic properties. Food Chemistry 122(4): 1139-1144
24. Zrnčić H., Zrnčić V. (2017). Bilje hrvatskih gora i planina. Hinus, Zagreb.

Mrežne stranice:

Web 1: <https://www.plantea.com.hr/cestoslavica/>

Web 2: <https://gospodarski.hr/rubrike/ljekovito-bilje-rubrike/cestoslavica-za-poboljsanje-zdravlja-i-bolje-pamcenje/>

Web 3: <https://www.agroklub.com/hortikultura/cestoslavica-jedini-pravi-lijek-za-sve/33051/>

Web 4: <https://www.plantea.com.hr/ljekovita-cestoslavica/#ljekovita+%c4%8destoslavica-5>

Web 5: <https://www.ricola.com/hr-hr/iskustvo-hr/bilje/nasih-13-vrsta-bilja/bilje/cestoslavica>

Web 6: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Web 7:

https://info.hazu.hr/upload/file/2019/04_Gajski_Uloga_komet_i_mikronukleus_testa_u_genetick_oj_toksikologiji_i_biomonitoringu_populacija.pdf

Web 8:

https://www.researchgate.net/post/Please_suggest_the_relevance_of_using_Normal_Melting_Point_Agar_and_Low_Melting_Point_Agar_while_doing_comet_assay/1

Web 9:

https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluoromic.html#:~:text=Fluorescent%20microscopy%20is%20often%20used,in%20a%20less%20specific%20manner

Web 10: <https://oni.bio/nanoimager/super-resolution-microscopy/epifluorescence-microscopy/#:~:text=What%20is%20epifluorescence%20microscopy%3F,intensity%20light%20source%20is%20used>

Web 11: <https://www.creative-biogene.com/support/hct-116-cell-line.html>

Web 12: <https://cansarblack.icr.ac.uk/cell-line/HCT-116/synopsis/overview>

Web 13: <https://www.atcc.org/products/ccl-247#:~:text=The%20HCT%20116%20cell%20line,of%20mutation%20in%20this%20codon>

METODIČKI DIO

Ime i prezime učitelja	Predmet	Razred
Ivana Klarica	Biologija	1. Razred SŠ.
Nastavna tema <i>Odrediti na osnovu godišnjeg izvedbenog kurikulumuma (GIK).</i>		Datum
Istraživanja u biologiji		Rujan 2022

Cilj nastavne teme <i>Odrediti u skladu s ciljem poučavanja dijela nastavne teme.</i>	
Usvajanje znanja o znanstvenoj metodi, sastavnicama znanstvenog rada (s naglaskom na varijable i hipotezu) i važnosti istraživanja u biologiji.	
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>
Znanstvena metoda, znanstveno istraživanje, hipoteza, zavisna varijabla, nezavisna varijabla, kontrolna varijabla, znanstveni rad, autorska prava	<ul style="list-style-type: none"> - Postoje znanstvena i stručna istraživanja - Znanstveno istraživanje je svako istraživanje u kojem dolazimo do novih spoznaja - Znanstvena metoda je postupak kojim dolazimo do novih otkrića - Rezultati znanstvenih istraživanja objavljuju se u znanstvenim časopisima u obliku znanstvenog rada - Znanstveni radovi doprinose svakodnevnom životu
Kontekst poučavanja koncepta <i>Sadržajni okvir učenja (na kojim će se primjerima učiti).</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - pomoću slika važnih znanstvenika iz područja biologije uvesti učenike u nastavnu jedinicu. - predložiti korake u znanstvenoj metodi na konkretnom primjeru znanstvenog istraživanja - na primjeru stručnog i znanstvenog istraživanja objasniti njihove razlike - analizom znanstvenog rada doći do saznanja o njegovim djelovima. - na primjeru objasniti važnost pouzdanih znanstvenih izvora, autorskih prava i njihovog pravilnog navođenja. 	


Odgojno-obrazovni ishodi <i>Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.</i>	
BIO SŠ D.1.1.	Primjenjuje osnovna načela i metodologiju znanstvenoga istraživanja te opisuje razvoj znanstvene misli tijekom povijesti
BIO SŠ D.1.2.	Raspravlja o etičkim pitanjima u biološkim istraživanjima i primjeni bioloških otkrića te donosi odluke o vlastitim postupanjima
Primjeri:	
OŠ PRI A.5.1. Učenik objašnjava temeljnu građu prirode	
BIO OŠ B.8.4. Povezuje različite načine razmnožavanja organizama s nasljeđivanjem roditeljskih osobina i evolucijom.	
BIO SŠ C.3.2. Analizira principe iskorištavanja energije na razini stanice.	

Očekivanja međupredmetnih tema <i>Odabrati i preslikati iz Kurikuluma uz oznaku (šifru) ishoda.</i>	
Ikt C.4.2.	Učenik samostalno provodi složeno pretraživanje informacija u digitalnome okružju.
Ikt C.4.3.	Učenik samostalno kritički procjenjuje proces, izvore i rezultate pretraživanja, odabire potrebne informacije.
Ikt D.4.3.	Učenik predočava, stvara i dijeli ideje i uratke o složenoj temi s pomoću IKT-a.
Uku D.3.2.	Učenik ostvaruje dobru komunikaciju s drugima, uspješno surađuje u različitim situacijama i spreman je zatražiti i ponuditi pomoć
Uku A.4/5.1.	Učenik samostalno traži nove informacije iz različitih izvora, transformira ih u novo znanje i uspješno primjenjuje pri rješavanju problema.

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 D.2.1.	D.2.1. Promatra i prikuplja podatke te donosi zaključke tijekom učenja i poučavanja.	<p>- Imenuj znanstvenike sa slike!</p> <p>- Predloži prvi korake istraživanja o genotoksičnosti hidrolata <i>V. officinalis</i> i <i>V. saturejoides</i> na HCT116 stanice.</p> <p>- Predloži skupni naziv svih koraka znanstvenog istraživanja.</p> <p>- Analiziraj primjere znanstvenog i stručnog istraživanja te zaključi po čemu se razlikuju.</p> <p>- Analiziraj znanstveni rad te nabroji njegove dijelove.</p> <p>- Laboratorijskim pokusom na biljci vodenoj kugi istraživano je kako udaljenost izvora svjetlosti utječe na brzinu fotosinteze pri istoj temperaturi. Kao pokazatelj intenziteta fotosinteze mjeren je broj mjehurića nastalih u vodi tijekom jedne minute. Rezultati pokusa nalaze se u tablici.</p> <table border="1" data-bbox="594 1304 1141 1604"> <tbody> <tr> <td>Udaljenost izvora svjetlosti (cm)</td> <td>100</td> <td>120</td> <td>150</td> <td>180</td> <td>200</td> </tr> <tr> <td>Broj mjehurića (min⁻¹)</td> <td>160</td> <td>110</td> <td>60</td> <td>40</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table> <p>c) Što zaključuješ temeljem ovog pokusa?</p>	Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	100	120	150	180	200	Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20	R2 R3 R2 R3 R1 R3	+- +- +- +- + +
Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	100	120	150	180	200											
Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20											

BIO SŠ D.2.1.	D.2.1.2. Postavlja hipotezu s pomoću predložka razlikujući zavisnu i nezavisnu varijablu te postavlja ciljeve istraživanja.	- Predloži hipotezu o utjecaju hidrolata na genom HCT116 stanica.	R3	+											
		- Odredi zavisnu i nezavisnu varijablu navedenog istraživanja.	R3	+ -											
		- Imenuj zavisnu i nezavisnu varijablu sljedećih hipoteza!													
		a) Glavni razlog globalnog zatopljenja je negativan čovjekov utjecaj.	R3	+ -											
		b) Povišena razina serotonina podiže raspoloženje i izaziva sreću.	R3	+ -											
	c) Banana će prije dozrijeti u prisutnosti jabuke.	R3	+ -												
	- Laboratorijskim pokusom na biljci vodenoj kugi istraživano je kako udaljenost izvora svjetlosti utječe na brzinu fotosinteze pri istoj temperaturi. Kao pokazatelj intenziteta fotosinteze mjereno je broj mjehurića nastalih u vodi tijekom jedne minute. Rezultati pokusa nalaze se u tablici.														
	<table border="1"> <tr> <td>Udaljenost izvora svjetlosti (cm)</td> <td>100</td> <td>120</td> <td>150</td> <td>180</td> <td>200</td> </tr> <tr> <td>Broj mjehurića (min⁻¹)</td> <td>160</td> <td>110</td> <td>60</td> <td>40</td> <td>20</td> </tr> </table>	Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	100	120	150	180	200	Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20		
Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	100	120	150	180	200										
Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20										
	b) Navedi: Zavisnu varijablu	R3	+ -												
	Nezavisnu varijablu	R3	+ -												
	Kontrolnu varijablu	R3	+ -												
BIO SŠ D.2.1.	D.2.1.3. Odabire primjerenu metodologiju i vrste uzoraka prema postavljenim ciljevima pravilno odabirući kontrolne	- Objasni važnost pozitivne i negativne kontrole.	R2	+											

	skupine i/ili replikatne (ponovljene) uzorke u istraživanju.															
BIO SŠ D.2.1.	D.2.1.4. Odabire primjerene metode za prikupljanje i prikaz podataka.	<ul style="list-style-type: none"> - Kako možemo provjeriti valjanost hipoteze? - Objasni koji pokus bi proveli za ispitivanje genotoksičnosti hidrolata. - Analiziraj rezultate istraživanja te zaključi kako ih najčešće prikazujemo. - Imenuj 3 vrste grafa na slici. - Zašto je važno grafički prikazati rezultate? - Objasni kakvi moraju biti uvjeti pokusa. - Nabroji neke uvjete pokusa. - Kojim varijablama pripadaju uvjeti pokusa? 	R1 R3 R2 R1 R3 R2 R1 R1	+ +- + + +- + + +												
BIO SŠ D.2.1.	D.2.1.6. Obraduje i prikazuje rezultate istraživanja.	<p>- Laboratorijskim pokusom na biljci vodenoj kugi istraživano je kako udaljenost izvora svjetlosti utječe na brzinu fotosinteze pri istoj temperaturi. Kao pokazatelj intenziteta fotosinteze mjeren je broj mjehurića nastalih u vodi tijekom jedne minute. Rezultati pokusa nalaze se u tablici.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20%;">Udaljenost izvora svjetlosti (cm)</td> <td>100</td> <td>120</td> <td>150</td> <td>180</td> <td>200</td> </tr> <tr> <td>Broj mjehurića (min⁻¹)</td> <td>160</td> <td>110</td> <td>60</td> <td>40</td> <td>20</td> </tr> </table> <p>a) Grafički prikaži rezultate!</p>	Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	100	120	150	180	200	Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20	R2	+
Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	100	120	150	180	200											
Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20											
BIO SŠ D.2.1.	D.2.1.7. Predstavlja dobivene rezultate na osnovi kojih donosi primjerene zaključke.	<p>- Laboratorijskim pokusom na biljci vodenoj kugi istraživano je kako udaljenost izvora svjetlosti utječe na brzinu fotosinteze pri istoj temperaturi. Kao pokazatelj intenziteta fotosinteze mjeren je broj mjehurića nastalih u vodi tijekom jedne minute. Rezultati pokusa nalaze se u tablici.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20%;">Udaljenost izvora</td> <td>100</td> <td>120</td> <td>150</td> <td>180</td> <td>200</td> </tr> </table>	Udaljenost izvora	100	120	150	180	200	R2	+						
Udaljenost izvora	100	120	150	180	200											

		<table border="1"> <tr> <td>svjetlosti (cm)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Broj mjehurića (min⁻¹)</td> <td>160</td> <td>110</td> <td>60</td> <td>40</td> <td>20</td> </tr> </table> <p>c) Što zaključuješ temeljem ovog pokusa?</p>	svjetlosti (cm)						Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20		
svjetlosti (cm)																
Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20											
BIO SŠ D.2.1.	D.2.1.8. Koristi se i navodi pouzdane literaturne izvore.	- Analiziraj jedan pouzdani znanstveni izvor te objasni što on sve mora sadržavati.	R3	+												
BIO SŠ D.2.1.	D.2.1.9. Opisuje osnovna znanstvena otkrića tijekom prošlosti važna za teme koje obrađuje i stavlja ih u povijesni kontekst.	<p>- Opiši znanstvenu metodu jednog od sljedećih bioloških otkrića te svoje rezultate objasni pomoću powerpoint prezentacije!</p> <p>★ Rad u grupi</p> 	R3	+/-												
BIO SŠ D.2.2.	D.2.2.1. Raspravlja o opravdanosti istraživanja na živim organizmima.	- Koristeći se pouzdanim znanstvenim izvorima pronađi prednosti i nedostatke istraživanja na živim organizmima. Objasni opravdavaš li ta istraživanja?	R1 R3	+ +												
BIO SŠ D.2.2.	D.2.2.3. Analizira primjenu bioloških otkrića u	<p>- Zašto su istraživanja u biologiji važna?</p> <p>- Nabroji neka otkrića iz područja biologije važna u svakodnevnom životu.</p> <p>-Svrstaj navedena istraživanja u znanstvena ili stručna!</p>	R2 R2 R2	+ + +												

	svakodnevnome životu.	a) Određivanje antibiograma (najefektnijeg antibiotika). b) Louis Pasteur osmislio cjepivo protiv bjesnoće. c) Pronalazak cjepiva protiv uzročnika COVID-19. d) Određivanje šećera u krvi.	R2 R2 R2	+ + +
BIO SŠ D.2.2.	D.2.2.5. Objašnjava važnost poštovanja autorskih prava te raspravlja o odgovornosti znanstvenika i cjelokupnoga društva pri korištenju rezultatima bioloških otkrića.	-Zašto su znanstvenici važni? - Kako znanstvenici dolaze do novih otkrića? - Objasni važnost objavljivanja znanstvenih radova. - Analiziraj sljedeći tekst: “U prethodnim istraživanjima ustanovljeno je kako hidrolati navedenih biljaka posjeduju citotoksični učinak zbog čega ovo istraživanje ima smisla provesti (Nazlić i sur., 2021)“ i objasni na što se odnosi navod u zagradi. - U kojem dijelu znanstvenog rada navodimo sve autore i njihove radove koji su nam poslužili u pisanju znanstvenog rada? - Analiziraj jedan navod autorskih prava te odredi što sve mora sadržavati. - Odnose li se autorska prava samo na tekstualne izvore? Ukoliko se ne odnose, daj primjer nekog drugog izvora.	R3 R3 R2 R2 R1 R3 R3	+ + + + + + +

Tijek								
<i>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 Kurikulum Prirode i Biologije – numerirana razrada ishoda) koji se njome ostvaruje.</i>								
Tip sata		Obrada novog nastavnog sadržaja		Trajanje		Jedan školski sat		
BR. NASTAVNOG	STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	DOMINANTNA AKTIVNOST		BR. ISHODA I MPT OČEKIVANJA	KORISTITI	METODA	OBLIK RADA	TRAJANJE (min)

Početni dio	<p>N -> Pozdravljam učenike i predstavljam im se. Otvaram powerpoint prezentaciju i pitam učenike što vide, odnosno prepoznaju li ljude na slici (U-> C. Darwin, J. Goodall, R1) te pomažem učenicima imenovati sve znanstvenike sa slika. N -> Kako jednom riječju možemo imenovati te ljude sa slike? (U -> znanstvenici, biolozi). N -> zašto su oni nama važni? (U-> otkrili su neke nepoznate stvari, R1). N -> kako su ti znanstvenici (biolozi) došli do otkrića? (U -> istraživanjem prirode, radom u laboratoriju itd., R2). N -> koja otkrića iz područja biologije su vama važna za svakodnevni život? (U -> istraživanja o mikroorganizmima, vodi za piće, hrani, medicinska istraživanja itd., R3).</p> <p>N-> otvaram kliznicu br.2 i najavljujem temu: Istraživanja u biologiji. Pišem naslov na ploču.</p> <p>U-> otvaraju svoje bilježnice i pišu naslov.</p>	<p>BIO SŠ D.1.2.</p>	<p>P P P</p>	<p>R</p>	<p>I F</p>	<p>3 m in</p>
Središnji dio	<p>N-> otvaram kliznicu br.3 i navodim učenicima da ćemo danas na temelju jednog istraživanja proći korake koji su bili potrebni kako bi se došlo do novih spoznaja. Pišem na ploču naziv istraživanja te pitam učenike s kojim pojmovima se po prvi put susreću (U -> genotoksičnost, hidrolat, R1).</p> <p>N -> razjašnjavam učenicima nepoznate pojmove nakon čega ih pitam što misle koji bi bio prvi korak, odnosno kako bi uopće došli do ideje za ovo istraživanje (U -> zapitali bi se utječe li dodatak hidrolata <i>V. officinalis</i> i <i>V. saturejoides</i> na genom HCT116 stanica, R3). Govorim učenicima da su u pravu te im pomažem formulirati naziv prvog koraka: postavljanje pitanja (otvaram prvu “kućicu” na kliznici s sumiranim prvim korakom, a navedeni postupak ponavljam nakon svakog koraka).</p> <p>N -> koji bi mogao biti drugi korak sad kad znamo tematiku istraživanja. (U -> provjeriti da li je tko drugi već odgovorio na ovo pitanje odnosno proveo istraživanje, R3) te kako bi to postigli (U -> pretraživanjem interneta, knjiga</p>	<p>BIO SŠ D.1.1. BIO SŠ D.1.2. Uku A.4/5. 1. Uku D.3.2.</p>	<p>P P</p>	<p>R</p>	<p>I F</p>	<p>1 2 m in</p>

		<p>itd., R3). Pomažem im da formuliraju naziv drugog koraka: pretraživanje podataka. Nakon što smo se uvjerali da nitko nije proveo ovo istraživanje idemo na treći korak, odnosno postaviti hipotezu (U -> hidrolati će biti genotoksični za HCT116 stanice, hidrolati neće biti genotoksični na HCT116 stanice, R3).</p> <p>N -> kako možemo provjeriti valjanost hipoteze? (U -> pokusom, R2) Koji pokus bi proveli? (U -> dokapali bi malo hidrolata na stanice te vidjeli imaju li oni utjecaj na genom, R3). Govorim učenicima da su u pravu te im navodim kako osim tretmana hidrolatima moramo provesti još 2 pokusa; jedan koji neće imati utjecaja na genom (negativna kontrola) i drugi koji hoće (pozitivna kontrola). Pitam učenike zašto je to važno (U -> kako bi mogli usporediti dobivene rezultate, R3). Pitam učenike što misle kakvi moraju biti uvjeti pokusa? (U -> jednaki za sve stanice i tretmane, R3). Pitam učenike da nabroje neke uvjete pokusa (U -> temperature, vlažnost, svjetlost itd., R2) te im govorim kako oni pripadaju kontrolnim varijablama.</p> <p>N -> navodim učenicima kako u pokusu moramo odrediti zavisnu i nezavisnu varijablu te im na kliznici pokazujem njihove definicije. Pitam učenike da odrede zavisnu i nezavisnu varijablu u ovom istraživanju (U -> zavisna varijabla je genotoksičnost, a nezavisna je hidrolat, R3). Upućujem učenike da u bilježnicu napišu definicije zavisne, nezavisne i kontrolne varijable.</p> <p>N -> koji korak slijedi nakon provedenog pokusa? (U -> analiza rezultata i usporedba s pozitivnom i negativnom probom, R3)</p> <p>N -> koji korak slijedi nakon analize rezultata? (U -> donošenje zaključka npr. hidrolati nisu genotoksični za HCT116 stanice, R3)</p> <p>N -> što radimo kad smo završili istraživanje? Ostavljamo li rezultate samo za sebe ili? (U -> pišemo rad koji možemo objaviti na internetu ili u časopisu, R3).</p>					
--	--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--	--

	N -> navodim učenicima kako svi ovi koraci imaju jedan skupni naziv te ih pitam da ga predlože (znanstveni postupci, znanstveni koraci itd., R3). Pomažem učenicima da dođu do termina znanstvena metoda.					
	N -> otvaram kliznicu br.4 te govorim učenicima da osim znanstvenih, postoje i stručna istraživanja. Upućujem učenike da pročitaju primjere tih istraživanja s kliznice te da zaključe po čemu se razlikuju. (U -> znanstvena istraživanja predstavljaju otkrića, nešto potpuno novo, dok stručna istraživanja služe za testiranje znanstvenih u svakodnevnom životu, R3). Po potrebi nadopunjavam učeničke zaključke.	BIO SŠ D.1.1. Uku A.4(5. 1.	P P	R T	I F	3 m in
	N-> rekli smo da nakon završenog znanstvenog istraživanja pišemo znanstveni rad. Otvaram znanstveni rad o prethodno spominjanoj temi, lagano prelazim preko svakog dijela rada te pomažem učenicima da imenuju njegove djelove (U -> naslov, uvod, materijal i metode itd., R1). Nazivi dijelova znanstvenog rada popraćeni su na kliznici.	BIO SŠ D.1.1. Ikt C.4.3.	P P T M	R T	I F	3 m in
	N-> ponovno pokazujem učenicima rezultate istraživanja te ih pitam kako ih najčešće možemo prikazati? (U -> pomoću grafa, R1) N -> otvaram kliznicu br.6 te pokazuje slikovne prikaze 3 vrste grafa te ih pitam da ih imenuju (U -> tortni tj. pie chart, stupčasti i linijski, R1). Pitam učenike zašto je važno u znanstveni rad uključiti grafove? (U -> lakše je iščitati rezultate, znanstvenici kojima jezik znanstvenog rada nije poznat mogu lakše doći do rezultata istraživanja, R3).	BIO SŠ D.1.1. Uku D.3.2. Uku A.4/5. 1..	P P T M	R T	F I	2 m in
	N-> prikazujem učenicima djelić teksta znanstvenog rada (npr. "U prethodnim istraživanjima ustanovljeno je kako hidrolati navedenih biljaka posjeduju citotoksični učinak zbog čega ovo istraživanje ima smisla provesti (Nazlić i sur., 2021)") te ih pitam na što se odnosi ovo u zagradi (U -> autora koji je došao do navedenog otkrića, R1). Pitam učenike u	.BIO SŠ D.1.1. Ikt C.4.3.	T M P P R L	R	I F	3 m in

	kojem dijelu znanstvenog rada navodimo sve autore i njihove radove koji su nam poslužili u pisanju znanstvenog rada? (U -> u popisu literature, R2). Pokazujem učenicima jedan navod autora i njegovog djela te ih pitam što on sve mora sadržavati (U -> ime i prezime, godinu objavljivanja rada, naslov znanstvenog rada itd., R1). Pokazujem učenicima i kako označavamo knjige u popisu literature te ih pitam što još mora imati naznačena autorska prava a da nije literatura. Do zaključka ih dovodim prikazujući djelić rada s slikom (U -> slike i grafovi, R1). Sumirane zaključke o autorskim pravima navodim na kliznici br.7.					
	N-> navodim učenicima kako znanstveni izvori moraju biti pouzdani a što to znači vidjeti ćemo na konkretnom primjeru. Dajem učenicima web adresu jednog izvora korištenog u istraživanju genotoksičnog utjecaja hidrolata na HCT116 stanice te ih upućujem da njegov sadržaj analiziraju u paru obraćajući pažnju na autore, izdavača, vrijeme objavljivanja i stil pisanja (popraćeno kliznicom br.8). Nakon 5 minuta analiziramo njihove zaključke.	BIO SŠ D.1.1. Ikt. C.4.2. Ikt. D.4.3 Uku D.3.2.	P P M O	R I	P F	4 m in
	N-> prikazujem učenicima kratak video o testiranjima na životinjama (kliznica br.9) nakon čega im postavljam pitanje: Da ste vi biolog bi ste li koristili životinje u svojim pokusima? Onaj tko bi neka podigne ruku u zrak.	BIO SŠ D.1.2.	P P V	R	I	2 m in
Završni dio Ponavljanje	N -> dijelim učenicima radne listove i listiće za samoprocjenu znanja. Govorim im da riješe svatko za sebe zadatak br. 3. Nakon nekoliko minuta prozivanjem učenika provjeravam njihove odgovore. Nakon što riješe zadatak br. 3 upućujem ih da riješe i zadatak br. 5. N -> prije kraja školskog sata objašnjavam učenicima domaći rad u kojem moraju napraviti kratku PPT prezentaciju o znanstvenoj metodi zadane teme (npr. o otkriću stanice). Dijelim ih u grupe od 4 učenika te im zadajem i preostale zadatke iz radnog lista za domaći rad. Najavljuem kako ćemo sljedeći sat	BIO SŠ D.1.1. BIO SŠ D.1.2. Uku D.3.2. Uku A.4/5. 1.	R L P P A L	I R	I F	5 m in

		<p>osim prezentacije o znanstvenoj metodi imati raspravu o pokusima za životinjama koja se nadovezuje na zadnji zadatak u radnom listu.</p> <p>N -> pozdravljam učenike, skupljam listiće za samoprocjenu znanja te im poželim ugodan ostatak dana.</p>	<p>Ikt C4.3.</p> <p>Ikt D.4.3.</p>				
<p>Nositelji aktivnosti: N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)</p> <p>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 (dodati prema potrebi)</p> <p>Metode: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje</p> <p>Oblici rada: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno</p>							

<p>Materijalna priprema <i>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 izvorna stvarnost kad god je to moguće, kao i nastavna sredstva te nastavna pomagala koja će se koristiti tijekom poučavanja i učenja.</i></p>
<p>Nastava sredstva: powerpoint prezentacija, radni list, udžbenik, znanstveni rad</p> <p>Nastava pomagala: projektor, računalo, ploča</p>

<p>Plan učeničkog zapisa <i>Može biti plan ploče ili zapis koji nastaje na temelju drugih poticaja.</i></p>
<p style="text-align: center;"><u>Istraživanja u biologiji</u></p> <p><u>Zavisna varijabla</u> – ono što mjerimo - genotoksičnost</p> <p><u>Nezavisna varijabla</u> – ono čiji učinak promatramo - hidrolat</p> <p><u>Kontrolna varijabla</u> – čimbenici koji utječu na istraživanje – temperatura, svjetlost itd.</p>

<p>Vrednovanje <i>Različiti pristupi vrednovanju.</i></p>

Vrednovanje za učenje	Vrednovanje kao učenje	Vrednovanje naučenog
<p>Opažanje rada učenika i angažiranosti za nastavnu jedinicu.</p> <p>Procjena sposobnosti zaključivanja na temelju opažanja.</p>	<p>Izlazne kartice za samoprocjenu (svaki učenik će sam sebi dati ocjenu o tom koliko je shvatio i razumio današnju nastavnu jedinicu).</p>	<p>Sljedeći sat slijedi analiza domaćeg rada.</p>

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

Nema učenika s teškoćama u učenju.

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).

- Powerpoint prezentacija



ISTRAŽIVANJA U BIOLOGIJI

1) POSTAVLJANJE PITANJA
• Utječe li hidrolat Vaginalis na HCT136 stanice?

2) FRETKOŽIVANJE POGODAKA
• Bilo je među Vaginalis i HCT136

3) POSTAVLJANJE HIPOTEZE
• Hidrolat će biti HCT136

4) ZAPISI

Zavisna varijabla – ono što mjerimo - genotoksičnost
Nezavisna varijabla – ono čiji učinak promatramo - hidrolat
Kontrolna varijabla – čimbenici koji utječu na istraživanje – temperatura, svjetlost itd.

5) ZAKLJUČAK
• Genotoksičnost

6) PODELI S DRUGIMA
• Objavljivanje znanstvenih radova

ZNANSTVENA ISTRAŽIVANJA

K. Landsteiner otkrio postojanje krvnih grupa i objasnio razloge ne uspjeha transfuzije krvi

STRUČNA ISTRAŽIVANJA

Određivanje krvne grupe prije transfuzije krvi

1964. otkriće ponavljajućih sekvenci DNA koje se pojavljuju u genomu na više od 2000 lokacija

1985. godine Lin i Luty razvijaju test salivne mikrostati

DNA profiliranje korištenjem mikrosatelita za utvrđivanje očitosti ili identifikaciju u forenzici

ZNANSTVENI RAD

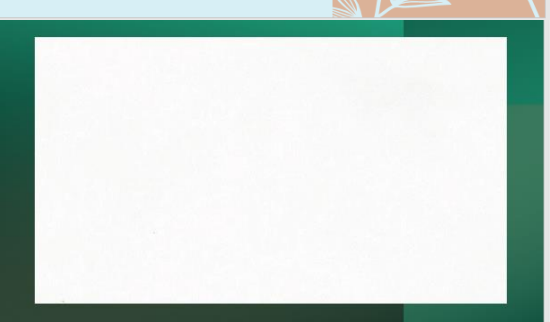
1. NASLOV
2. UVOD
3. MATERIJAL I METODE
4. REZULTATI
5. RASPRAVA
6. ZAKLJUČAK
7. SAŽETAK
8. LITERATURA

REZULTATI

TORTNI STUPČASTI LINUSKI

AUTORSKA PRAVA

- Valjano navesti autora teksta, slike, animacije, videa ...
- Npr. Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. (2015), Endemi u hrvatskoj flori. Alfa, Zagreb.



PONAVLJANJE

radni list: zadatak 3 i 5

Ime i prezime	
Razred	
grupa	

RADNI LIST
ISTRAŽIVANJA U BIOLOGIJI

1. Zašto su istraživanja u biologiji važna?

2. Navedi nekoliko primjera važnih bioloških otkrića!

3. Imenuj zavisnu i nezavisnu varijablu sljedećih hipoteza!

- a) Glavni razlog globalnog zatopljenja je negativan čovjekov utjecaj.

Zavisna - _____

Nezavisna - _____

- b) Povišena razina serotonina podiže raspoloženje i izaziva sreću.

Zavisna - _____

Nezavisna - _____

- c) Banana će prije dozrjeti u prisutnosti jabuke.

Zavisna - _____

Nezavisna - _____

4. Laboratorijskim pokusom na biljci vodenoj kugi istraživano je kako udaljenost izvora svjetlosti utječe na brzinu fotosinteze pri istoj temperaturi. Kao pokazatelj intenziteta fotosinteze mjereno je broj mjehurića nastalih u vodi tijekom jedne minute. Rezultati pokusa nalaze se u tablici.

Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	100	120	150	180	200
Broj mjehurića (min ⁻¹)	160	110	60	40	20

- a) Grafički prikaži rezultate!

- b) Navedi:
Zavisnu varijablu - _____
Nezavisnu varijablu - _____
Kontrolnu varijablu - _____
- c) Što zaključuješ temeljem ovog pokusa?

5. Svrstaj navedena istraživanja u znanstvena ili stručna!
- | | |
|----------------------------------------------------------|------------|
| a) Određivanje antibiograma (najefektnijeg antibiotika). | |
| b) Louis Pasteur osmislio cjepivo protiv bjesnoće. | ZNANSTVENA |
| c) Pronalazak cjepiva protiv uzročnika COVID-19. | STRUČNA |
| d) Određivanje šećera u krvi. | |

DOMAĆI RAD

6. Opiši znanstvenu metodu jednog od sljedećih bioloških otkrića te svoje rezultate objasni pomoću powerpoint prezentacije!

★ Rad u grupi



7. Koristeći se pouzdanim znanstvenim izvorima pronađi prednosti i nedostatke istraživanja na živim organizmima. Objasni opravdavaš li ta istraživanja?

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

Grozdanić G., Horvatin K., Kristanac Ž., 2019.: Biologija 1 – udžbenik Biologije za 1. razred gimnazije, Profil Klett, Zagreb

<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/074ffbb3-a1b7-4fe1-9f4a-1ea3539d642d/biologija-1/m01/j02/index.html>

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