Utjecaj UV-zračenja na dostupnost peptidnih veza u kolagenu

Matko Celić, 3. razred

Gimnazija Petra Preradovića Virovitica, Virovitica
Mentor: *Ines Tovarović*

SAŽETAK

Cilj ovog istraživačkog rada bio je ispitati utjecaj UV-zračenja na strukturu polipeptidnih lanaca kolagena primjenom biuret-reakcije i analize promjene obojenja. Eksperiment je počeo pripremom 6 uzoraka otopina kolagena poznatih masenih koncentracija kojima se dodala 10 %-na otopina NaOH i razrijeđena vodena otopina $CuSO_4$. Reakcija tih spojeva poznata je i kao biuret-reakcija koja može pokazati dostupnost peptidnih veza u proteinu na temelju intenziteta ljubičaste obojenosti otopine. Pripremljene su i eksperimentalne skupine koje su bile izložene različitim vremenskim intervalima UV-zračenja. Nakon izlaganja UV-zračenju uzorcima je izmjeren intenzitet obojenosti otopine kolagena pomoću RGB vrijednosti dobivenih preko mobilne aplikacije. Te vrijednosti zatim su pretvorene u luminaciju iz koje je napravljen graf ovisnosti luminacije i masenog udjela te njegova linija trenda. Dobiveni rezultati i linija trenda pokazuju da UV-zračenje utječe na dostupnost peptidnih veza u kolagenu, tj. na promjenu u strukturi proteina povezanu s procesima fotostarenja. Uočen je nelinearan učinak UV-zračenja na luminaciju. Nakon kratkog izlaganja otopine kolagena UV-zračenju došlo je do smanjenja broja dostupnih peptidnih veza, pri izlaganju od 10 minuta zabilježeno je povećanje njihove dostupnosti, dok je pri duljem izlaganju (15 – 25 minuta) ponovno došlo do smanjenja obojenja otopine što se objašnjava kumulativnim smanjenjem dostupnosti peptidnih veza. Takvi rezultati mogu se objasniti istodobnim odvijanjem različitih procesa koji rezultiraju promjenama prostorne strukture molekule kolagena. Promjene povećanja intenziteta obojenosti nakon biuret-reakcije tumače se djelomičnim odmotavanjem triju polipetidnih lanaca koji izgrađuju molekulu kolagena, dok je smanjenje intenziteta obojenosti otopine nakon biuret-reakcije rezultat dodatnog uvijanja lanaca pri duljem izlaganju otopine UV-zračenju.

Ključne riječi: *protein; fotostarenje; RGB vrijednost; biuret-reakcija*

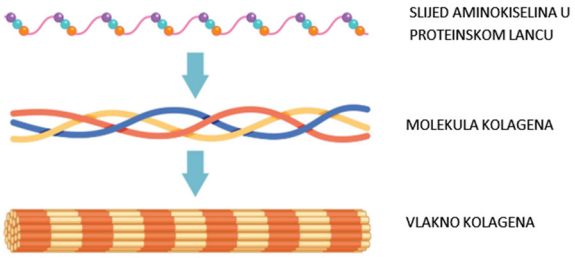
UVOD

Jedina univerzalna sudbina svih živih bića je starenje, koje predstavlja postupni gubitak fizioloških funkcija te smanjenu sposobnost regeneracije stanica, tkiva i organa (Guo i sur., 2022). Koža je najveći organ čovjeka i posebno je osjetljiva na promjene povezane sa starenjem, jer se one na njoj vide najjasnije. Na starenje kože utječu unutarnji čimbenici poput genetike i hormonalnih promjena te vanjski čimbenici, među kojima se ističu ultraljubičasto (UV) zračenje, zagađenje zraka, kronične upale i poremećaj mikrobioma (Lee i sur., 2021). Poseban značaj ima UV-zračenje, koje dovodi do fotostarenja. Prema Vierkötter i Krutmann (2012), fotostarenje je kumulativni degenerativni proces izazvan ponovljenim izlaganjem sunčevom svjetlu, a manifestira se pojavom bora, gubitkom elastičnosti i promjenama pigmentacije kože.

Koža se sastoji od tri osnovna sloja: površnog epidermisa, dubljeg dermisa i potkožnog masnog tkiva. Dermis sadrži najveću količinu kolagena, pri čemu su najvažniji tipovi I, III i V (Bar & Valiukevičienė, 2025). Kolagen je osnovni strukturni protein svih kralježnjaka, a osim u koži nalazi se i u kostima, tetivama te hrskavici, gdje osigurava mehaničku potporu i otpornost tkiva (Bar & Valiukevičienė, 2025). Svi tipovi kolagena građeni su od tri polipeptidna lanca koji se spiralno omataju u trostruku zavojnicu (slika 1), no razlikuju se u debljini i funkciji vlakana: kolagen tipa I gradi debela vlakna odgovorna za čvrstoću, tip III čini tanja i fleksibilnija vlakna koja pridonose elastičnosti, dok tip V stvara vrlo fina vlakna i regulira stvaranje ostalih kolagenskih vlakana (Ricard-Blum, 2011). Svaki polipeptidni lanac sastoji se od ponavljajućih aminokiselina, među kojima prevladavaju glicin, prolin i hidroksiprolin. Aminokiseline su povezane peptidnim vezama, a cijela struktura dodatno je stabilizirana vodikovim

Autori zadržavaju autorska prava te časopisu daju pravo prvog objavljivanja rada u skladu s licencijom CC BY 4.0, koja dopušta drugima dijeljenje rada uz navođenje autorstva i izvornog mjesta objavljivanja rada u časopisu.

vezama između lanaca, što kolagenima daje veliku čvrstoću i otpornost na rastezanje (Shoulders i Raines, 2009).



Slika 1 Razine organizacije kolagena

Izvor: https://www.freepik.com/free-vector/collagen-structure-formation-process_255947945.htm#fromView=search&page=1&position=0&uuid=4e62c0e8-768e-4eea-9bab-33a8cc9fb777&query=colagen+structure

Osim vodikovih veza, stabilnost i mehanička otpornost kolagena dodatno se osiguravaju kovalentnim unakrsnim vezama (*cross-links*) koje nastaju između molekula, a mogu nastati pomoću enzima, npr. djelovanjem lizil-oksidaze ili pomoću glikacije, tj. vezanja šećera na proteine (Shoulders i Raines, 2009). Kolagen se danas koristi i kao dodatak prehrani u obliku praha, najčešće dobivenog iz goveda ili ribe, a smatra se da može doprinijeti obnovi kolagena u koži i ublažiti učinke starenja (Bar i Valiukevičienė, 2025).

UV-zračenje dio je Sunčeva spektra i može imati i pozitivne i negativne učinke. U kontroliranim količinama UVB-zrake potiču sintezu vitamina D u koži, koji je ključan za zdravlje kostiju i imunološkog sustava (Holick, 2004). Međutim, prekomjerno izlaganje UV-zračenju ima štetne posljedice. Do Zemljine površine dopiru UVA (315 – 400 nm) i UVB (280 – 315 nm) zrake, dok je UVC (100 – 280 nm) u potpunosti zaustavljen ozonskim omotačem (Diffey, 2002; ICNIRP, 2004). UVA-zrake prodiru dublje u dermis, gdje potiču stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu negativno utjecati na kolagen, dok UVB uglavnom djeluje na epidermis, uzrokujući oštećenja DNA i upalne procese (Kammeyer i Luiten, 2015). Prema Fisher i sur. (1997), izlaganje ljudske kože UV-zračenju dovodi do povećanja aktivnosti enzima matriksnih metaloproteinaza (MMPs), što rezultira ubrzanom razgradnjom postojećeg kolagena tipa I i smanjenom sintezom novog.

Osim Sunčeva zračenja, ljudi se izlažu i umjetnim izvorima UVA-zračenja, poput solarija i UV-lampi za učvršćivanje gel lakova. U solarijima prevladava UVA-zračenje, dok je udio UVB-zraka manji (ICNIRP, 2010). Nova istraživanja pokazala su da UV-lampe za nokte, koje emitiraju UV-zračenje u području 340 – 395 nm, mogu uzrokovati oksidativno oštećenje DNA, mutacije i poremećaje rada mitohondrija u ljudskim stanicama (Zhivagui i sur., 2023). Time se potvrđuje da i svakodnevni, kozmetički izvori UV-zračenja mogu pridonijeti fotostarenju kože.

Budući da se kolagen u koži nalazi u dermisu i nije izravno izložen UV-zračenju, dosadašnja istraživanja uglavnom su bila usmjerena na posredne učinke UV-zračenja putem aktivacije enzima matriksnih metaloproteinaza i njihove uloge u razgradnji kolagena (Fisher i sur., 1997). Svrha ovog istraživanja bila je ispitati kako UV-zračenje može utjecati na kolagen i time pridonijeti procesima starenja kože. Iz svrhe proizlazi i cilj ovog istraživačkog rada koji je ispitati izravan utjecaj UV-zračenja na kolagen. Provođenjem biuret reakcije i intenzitetom ljubičastog obojenja koje je nastalo nakon biuret reakcije u istraživanju se želi ispitati kako će UV-zračenje utjecati na promjene strukture kolagena. Predviđa se utjecaj UV-zračenja na međumolekulske interakcije između polipeptidnih lanaca koji izgrađuju

kolagen, na način da dolazi do njihovog razmicanja ili jačeg uvijanja. U radu je korišten otopljen hidrolizirani riblji kolagen u prahu tipa I i III. Kao izvor UVA-zračenja upotrijebljena je UV-lampa za nokte, koja s jedne strane predstavlja pojednostavljenu zamjenu za Sunčevo zračenje, a s druge realan izvor kojem su ljudi izloženi u kozmetičkim salonima. Upravo iz tih razloga motivacija ovog istraživanja bila je ispitati može li takvo zračenje izazvati promjene u strukturi kolagena koje upućuju na potencijalne procese fotostarenja.

Nezavisna varijabla ovog istraživanja je UV-zračenje, tj. vrijeme izloženosti otopine kolagena UV-zračenju, a zavisna varijabla je intenzitet obojenosti otopine kolagena nakon biuret-reakcije. Dobiveni rezultat govori o promjeni dostupnosti peptidnih veza u lancima kolagena nakon izlaganja otopine kolagena UV-zračenju. UV-zračenje važan je čimbenik starenja kože jer uzrokuje promjene u proteinima koji se nalaze u dermisu. Zbog toga se očekuju mjerljive promjene u strukturi kolagena nakon izlaganja njegove otopine UV-zračenju.

Kako bi se ispitalo može li UV-zračenje oštetiti peptidne veze u kolagenu i time utjecati na njegovu strukturu, korištena je biuret-reakcija kao pokazatelj promjena. Ova metoda temelji se na stvaranju kompleksa između Cu^{2+} iona i najmanje dviju peptidnih veza proteina, pri čemu nastaje ljubičasto obojenje otopine čiji se intenzitet uobičajeno mjeri spektrofotometrijski. Budući da u školi nije dostupan spektrofotometar, intenzitet obojenosti mjerio se pomoću aplikacije za analizu boje (RGB), pri čemu je on proporcionalan količini peptidnih veza koje sudjeluju u reakciji, odnosno očuvanosti proteinske strukture (Adnan, 2023).

Na temelju cilja istraživanja postavljene su sljedeće hipoteze:

1. Intenzitet ljubičastog obojenja otopine kolagena smanjivat će se proporcionalno s duljinom izlaganja UV-zračenju.
2. Kraće izlaganje UV-zračenju (5-10 minuta) neće značajno utjecati na promjenu dostupnosti peptidnih veza u proteinskom lancu i neće uzrokovati značajnu promjenu boje otopine kolagena.
3. Dulje izlaganje otopine kolagena UV-zračenju (15-25 minuta) dovest će do postupnog slabljenja ljubičastog obojenja uslijed kumulativnih promjena koje dovode do smanjenja dostupnosti peptidnih veza u proteinskim lancima.

METODE RADA

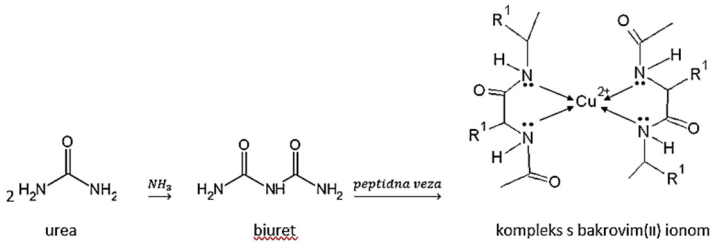
Istraživanje je provedeno s ciljem ispitivanja utjecaja UV-zračenja na strukturu kolagena, jednog od najvažnijih strukturnih proteina u ljudskom tijelu. Kao izvor kolagena korišten je BioLife Collagen Premium – Pure Peptide, dodatak prehrani koji sadrži hidrolizirani riblji kolagen tipa I i III u obliku finog bijelog praha. Proizvod je 100 % čisti riblji kolagen, bez dodataka šećera i aroma, te je poslužio kao polazni materijal za pripremu uzoraka (slika 2).



Slika 2 Prikaz pakiranja ribljeg kolagena korištenog u istraživanju
Autor: Celić M., 2025

U kontrolnoj i eksperimentalnoj skupini provedena je biuret-reakcija. To je reakcija kojom se ispituje dostupnost peptidnih veza u proteinima. Tijekom reakcije nastaje ljubičasta obojenost otopine, čiji intenzitet ovisi o broju dostupnih peptidnih veza. Promjena boje nakon UV-zračenja ukazuje na promjene u strukturi kolagena zbog kojih dolazi do povećane ili smanjene dostupnosti peptidnih veza na koje se veže bakar.

Karakteristično obojenje nastaje zbog stvaranja kompleksa bakrovih(II) ionima s peptidnom vezom (slika 3).



Slika 3 Shematski prikaz stvaranja kompleksa u biuret-reakciji

Priprema uzoraka poznatih masenih koncentracija kolagena i kontrole

Pripremljeno je sedam različitih otopina kolagena koje su se razlikovale prema masenim koncentracijama (tablica 1). Svaka otopina pripremljena je u volumenu od 20 mL, a potrebna masa kolagena računata je prema sljedećoj formuli:

$$\gamma(\text{kolagena}) = \frac{m(\text{kolagena})}{V(\text{otopine})}$$

Masa kolagena vagana je na analitičkoj vagi marke KERN® s točnošću od 0,0001.

Tablica 1 Masene koncentracije otopina kolagena korištene za izradu kalibracijske krivulje

oznake pojedine epruvete	γ / g L^{-1}
Ep 1	45
Ep 2	40
Ep 3	35
Ep 4	30
Ep 5	22,5
Ep 6	15
Ep 7	7,5
K	0

Prema Sikirici (2018) po 6 mL svake otopine odmjereno je u tri epruvete te je mjerenje provedeno na tri uzorka kako bi se dobile što točnije vrijednosti mjerenja. Volumen otopine mjeren je pipetom. Zadnje tri epruvete sadržavale su samo vodu te su predstavljale kontrolnu skupinu.

Zatim je u svaku epruvetu stavljeno po 6 mL 10 %-tne otopine NaOH. Sadržaj epruvete je promućkan, a u dobivenu otopinu dodano je još 6 kapi razrijeđene otopine bakrovog(II)sulfata ($CuSO_4$). Nakon dodatka otopine bakrovog(II)sulfata sadržaj epruvete je ponovno promućkan nakon čega je došlo do obojenja otopine.

Za istraživanje su korištenje sve potpuno jednake epruvete da bi visina stupca otopine u epruveti bila jednaka i da promjer stupca otopine u epruveti ne bi utjecao na rezultate mjerenja.

Priprema eksperimentalnih skupina

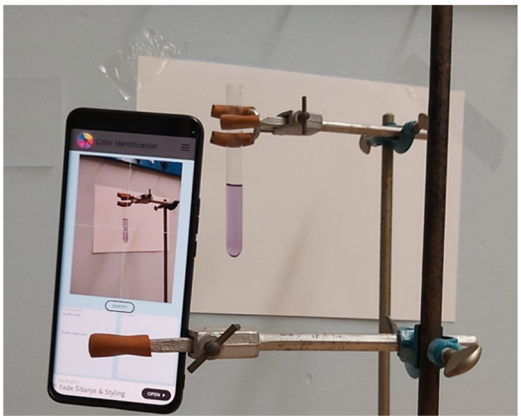
Eksperimentalna skupina pripremljena je od otopine kolagena masene koncentracije 30 g L^{-1}. Otopina te masene koncentracije odabrana je zato što je to bila prosječna koncentracija svih otopina uzoraka koji su služili za izradu kalibracijske krivulje. Zatim je po 6 mL svakog uzorka raspoređeno u 5 epruveta i u njih je dodano 6 mL 10 %-tne otopine NaOH i 6 kapi razrijeđene otopine $CuSO_4$.

Kao izvor UV-zračenja korištena je UV/LED lampa marke SUNmini, koja emitira svjetlost valne duljine između 100 i 400 nm i snage 6 W. Lampa sadrži 6 LED dioda koje omogućuju ravnomjerno izlaganje uzoraka UV-zračenju. Za svaki uzorak je po 30 mL otopine uliveno u Petrijevu zdjelicu i izlagano je UV-zračenju u trajanju od 5, 10, 15, 20 i 25 minuta. Nakon izlaganja, uzorci su pipetiranjem vraćeni u epruvete radi daljnje analize.

Kvantitativna analiza boje uzoraka

Intenzitet crvene, plave i zelene boje u svim uzorcima, kontrolnim i eksperimentalnim, mjerena je pomoću mobilne aplikacije Color Identification, koja registrira RGB vrijednosti (Red-Green-Blue) i omogućuje kvantitativno praćenje promjena u boji pri različitim koncentracijama kolagena kao i nakon izlaganja UV-svjetlosti.

Mjerenja su provedena mobilnim uređajem Honor Magic 6 Lite, učvršćenim na stativ na udaljenosti od 30 cm od uzorka (slika 4). Svaka epruveta fotografirana je ispred bijele pozadine, pri jednakom osvjetljenju i pod istim kutom snimanja, čime su osigurani ujednačeni uvjeti mjerenja.



Slika 4 Postupak mjerenja RGB vrijednosti otopina kolagena pomoću mobilne aplikacije
Autor: Celić M., 2025.

Budući da RGB sustav daje tri odvojene numeričke vrijednosti (R, G i B), za lakšu interpretaciju i usporedbu rezultata korištena je formula lume (*Y'*), koja predstavlja ukupnu svjetlinu slike. Luma odgovara aproksimaciji luminancije (*Y*), odnosno percipirane svjetline dobivene iz RGB vrijednosti prema standardnoj formuli (Telestream, 2017):

$$Y' = 0{,}299 \cdot R + 0{,}587 \cdot G + 0{,}114 \cdot B$$

Luma vrijednosti dobivene mjerenjem eksperimentalnih uzoraka uspoređene su s otopinama kolagena poznatih masenih koncentracija kako bi se utvrdila promjena u dostupnosti peptidnih veza nakon izlaganja uzoraka različitom trajanju UV-zračenja. Na temelju toga, procijenjen je stupanj promjene u strukturi proteina nakon izlaganja UV-zračenju.

Statistička obrada podataka

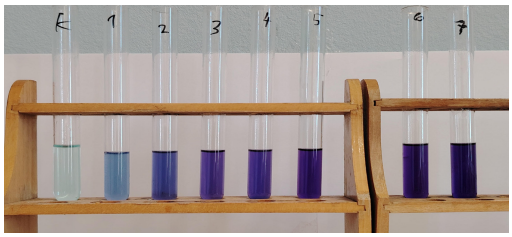
Podaci su obrađeni pomoću programa Microsoft Excel. Za svaku skupinu uzoraka izračunate su aritmetičke sredine dobivenih luma vrijednosti.

Kalibracijska krivulja izrađena je na temelju otopina kolagena poznatih masenih koncentracija te prikazuje ovisnost prosječne luma vrijednosti (Y') o masenoj koncentraciji kolagena.

Jednofaktorska ANOVA provedena je u Excelu za ispitivanje razlika između uzoraka izloženih različitim vremenima UV-zračenja.

REZULTATI

Nakon pripreme otopina poznatih masenih koncentracija kolagena i provođenja biuret-reakcije uočeno je različito obojenje svake pojedine otopine. Sve otopine osim kontrolnog uzorka (zadnja epruveta na slici 5 - plava otopina) bile su obojene u nijansama ljubičaste boje (slika 5).

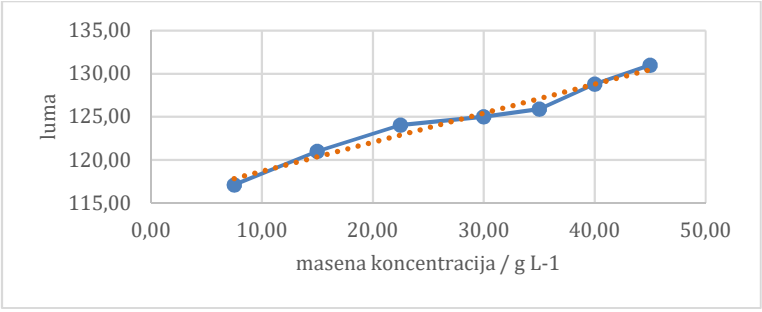


Slika 5 Obojenost otopina poznatih masenih koncentracija kolagena nakon provođenja biuret-reakcije (s lijeva na desno kontrola, 7,5 g L^{-1}, 15 g L^{-1}, 22,5 g L^{-1}, 30 g L^{-1}, 35 g L^{-1}, 40 g L^{-1}, 45 g L^{-1})

Autor: Celić M., 2025.

Pripremljenim otopinama kolagena poznatih masenih koncentracija izmjerena je vrijednost intenziteta crvene (R), zelene (G) i plave (B) boje. Mjerenje je provedeno na 5 istovjetnih uzoraka (uzorci iste masene koncentracije) i ponovljeno je 5 puta. Tako je za svaki uzorak poznate masene koncentracije dobiveno ukupno po 25 vrijednosti jačine za svaku boju. Iz dobivenih vrijednosti najprije je izračunata prosječna vrijednosti svake pojedine boje, a zatim vrijednost lume za svaku izmjerenu otopinu. Konačno je izmjerena i prosječna vrijednost lume za svih 5 uzoraka iste masene koncentracije otopine kolagena. Na temelju dobivenih vrijednosti lume i masene koncentracije otopine kolagena u programu Excel izrađena je krivulja ovisnosti. Slika 5 prikazuje ovisnost vrijednosti lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena.

Iz grafa na slici 6 može se vidjeti proporcionalna ovisnost lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena. Što je koncentracija kolagena veća u otopini se nalazi više peptidnih veza koje reagiraju s biuretom i daju veći intenzitet obojenosti otopine. Što je jača obojenost otopine kolagena, veći je iznos lume.

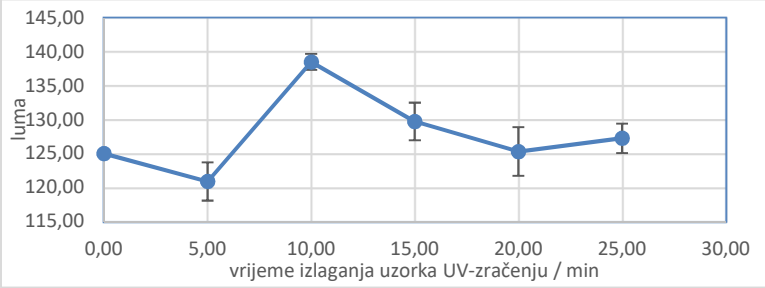


Slika 6 Ovisnosti izmjerene vrijednosti lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena

Na slici 6 crvenom istočkanom linijom prikazana je linija trenda (linearna) ovisnosti lume o masenoj koncentraciji otopine kolagena i dostupnosti peptidnih veza u proteinskim lancima zbog koje se također mijenja intenzitet obojenja otopine kolagena, pa se zbog toga te dvije vrijednosti mogu se povezati.

Za ispitivanje utjecaja UV-zračenja na dostupnost peptidnih veza u kolagenu korištena je otopina masene koncentracije 30 g L^{-1}. Otopina kolagena izložena je različitom vremenu UV-zračenja. Svaka otopina raspodijeljena je u 5 epruveta i mjerena je RGB vrijednost. Svako mjerenje ponovljeno je 5 puta kao u slučaju otopina kolagena poznatih masenih koncentracija.

Izračunata je prosječna vrijednost lume za svaki uzorak, a ovisnost prosječne vrijednosti lume o trajanju izloženosti UV-zračenju prikazan je grafom (slika 7).



Slika 7 Ovisnost vrijednosti lume o vremenu izlaganja otopine UV-zračenju

Budući da masena koncentracija kolagena u eksperimentalnoj skupini nije bila mijenjana tijekom pokusa, promjene u vrijednosti lume tumače se kao posljedica promjena u strukturi polipeptidnih lanaca kolagena uzrokovanih UV-zračenjem. Ta promjena strukture očituje se u dostupnosti peptidnih veza na koje se mogao vezati bakrov(II) ion i stvarati biuret kompleks. Na slici 6 prikazana je ovisnost vrijednosti lume, kao pokazatelja intenziteta obojenosti nakon biuret reakcije, o vremenu izlaganja otopine kolagena UV-zračenju.

U otopini koja je bila najkraće izložena UV-zračenju zabilježeno je smanjenje vrijednosti lume u odnosu na početno stanje. Kod uzoraka izloženih UV-zračenju između 5 i 10 minuta zabilježen je porast vrijednosti lume. Pri daljnjem produljenju vremena izlaganja UV-zračenju vrijednost lume ponovno se smanjuje, ali manjim intenzitetom. Za vrijeme izlaganja duljem od 20 minuta ne uočavaju se značajne promjene vrijednosti lume.

Jednofaktorska ANOVA provedena na eksperimentalnim uzorcima nije pokazala statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima lume između uzoraka izloženih različitim vremenima UV-zračenja ($p = 0,696$). Na grafu se vidi promjena, ali mjerenja u ponavljanjima nisu bila dovoljno ujednačena. Zbog toga test ne može sa sigurnošću reći da su razlike stvarne, a ne posljedica mjerenja.

RASPRAVA

Ovim istraživačkim radom ispitan je izravan utjecaj UV-zračenja na strukturu polipeptidnih lanaca kolagena s naglaskom na promjene u dostupnosti peptidnih veza. Iako se u fiziološkim uvjetima kolagen u koži ne nalazi izravno izložen UV-zračenju, već je smješten u dermisu, ovakav pojednostavljeni model omogućio je izolirano proučavanje samog proteina, neovisno o enzimskim i staničnim procesima. Time su ostvareni cilj i svrha rada navedeni u uvodu, gdje je istaknuta ključna

uloga kolagena u procesu starenja kože te važnost UV-zračenja kao glavnog vanjskog čimbenika fotostarenja.

Rezultati dobiveni biuret-reakcijom i analizom boje putem RGB vrijednosti pokazali su da intenzitet ljubičastog obojenja ovisi o masenoj koncentraciji otopine kolagena, što potvrđuje ispravnost korištenja ove metode za ispitivanje dostupnosti peptidnih veza u proteinskim lancima kolagena. Time je osigurana pouzdana osnova za usporedbu vrijednosti lume za uzorke poznate masene koncentracije kolagena i eksperimentalnih uzoraka, čime se ostvaruje metodološka povezanost između dijela „Materijali i metode“ i „Rezultata“.

U skladu s postavljenim hipotezama, rezultati su pokazali da izlaganje UV-zračenju može dovesti do promjena u dostupnosti peptidnih veza u kolagenu. U prvih 5 minuta izlaganja otopine UV-zračenju uočen je pad intenziteta obojenja u odnosu na kontrolni uzorak, što upućuje na početne strukturne promjene kolagena. Ovaj nalaz podudara se s navodima iz literature da UV-zračenje, osobito UVA, potiče stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu uzrokovati oksidaciju aminokiselina i destabilizaciju proteinskih struktura (Kammeyer i Luiten, 2015). Time se potvrđuje da čak i relativno kratko izlaganje može imati mjerljiv učinak na strukturu proteina. U otopini koja je bila najkraće izložena UV-zračenju došlo je do smanjenja dostupnosti peptidnih veza u lancima kolagena zbog čega se obojenje otopine smanjilo i mjerene vrijednosti RGB dale si niže vrijednosti lume.

U otopini koja je bila izložena UV-zračenju više od 5, a manje od 10 min uočena je povećana dostupnosti peptidnih veza što se očitovalo višim RGB vrijednosti i većim luma vrijednostima.

Izloženost otopine kolagena UV-zračenju dulje od 10 minuta dovodi do smanjenja luma vrijednosti, što upućuje na manji intenzitet obojenosti nakon biuret-reakcije i smanjenu dostupnost peptidnih veza u lancima kolagena.

Daljnje produženje izlaganja na više od 15 minuta nije dovelo do značajnih promjena luma vrijednosti, što upućuje na minimalne ili izostale daljnje promjene u dostupnosti peptidnih veza.

Prva hipoteza nije u potpunosti potvrđena jer se intenzitet obojenosti otopine smanjuje u slučaju kratkotrajnih izlaganja otopine kolagena UV-zračenju (< 5 minuta) i dugih izlaganja otopine kolagena UV-zračenju (> 10 minuta). Otopini koja je bila izložena UV-zračenju dužem od 5 minuta povećao se intenzitet obojenosti nakon provedene biuret-reakcije.

Rezultat dobiven nakon 10 minuta izlaganja UV-zračenju, pri kojem je zabilježeno povećanje intenziteta obojenja nije u skladu s hipotezom o postupnom smanjenju dostupnosti peptidnih veza, ali se može objasniti djelomičnom denaturacijom kolagena. UV-zračenje moglo je uzrokovati djelomično razmicanje polipeptidnih lanaca i izlaganje peptidnih veza koje su u početnom stanju bile manje dostupne bakrovim(II) ionima. Slični učinci opisani su u istraživanjima proteina gdje blaga denaturacija dovodi do povećane kemijske reaktivnosti bez potpune razgradnje molekule (Ricard- Blum, 2011). Ovi rezultati upućuju da UV-zračenje ne djeluje isključivo destruktivno, već može uzrokovati i privremene strukturne promjene.

Kod duljih vremena izlaganja (15, 20 i 25 minuta) rezultati su pokazali postupno smanjenje intenziteta obojenja, što je u skladu s trećom hipotezom o kumulativnom smanjenju dostupnosti peptidnih veza. Ovi rezultati podupiru nalaze Fishera i sur. (1997), koji navode da dugotrajno UV-zračenje dovodi do razgradnje kolagena i smanjene sinteze novih kolagenskih vlakana u koži. Iako u ovom istraživanju nisu

bili prisutni enzimi matriksnih metaloproteinaza, rezultati upućuju na to da UV-zračenje može imati i izravan negativan učinak na strukturu proteina.

Kod izlaganja otopine kolagena vremenskim intervalima dužim od 15 minuta nije došlo do velikih dodatnih promjena u izmjerenim vrijednostima. Ovaj efekt zasićenja može značiti da je većina UV-osjetljivih peptidnih veza već zahvaćena promjenama ili da daljnje promjene nisu dovoljno velike da bi ih korištena metoda detektirala. To upućuje na ograničenja biuret-reakcije i RGB analize boje, ali i na stabilnost određenog dijela kolagenske strukture.

Druga hipoteza, prema kojoj kraće izlaganje UV-zračenju neće značajno utjecati na promjenu boje otopine, nije potvrđena. Najveća promjena obojenosti zabilježena je nakon 10 minuta izlaganja UV-zračenju. Ovaj rezultat upućuje na osjetljivost kolagena, čak i u hidroliziranom obliku, na UV-zračenje. Ovakav rezultat može se povezati s činjenicom da hidrolizirani kolagen sadrži kraće polipeptidne lance koji su strukturno manje stabilni od nativne trostruke zavojnice kolagena u koži (Shoulders i Raines, 2009), što ih čini podložnijima oštećenju. Izlaganje lanaca kolagena UV-zračenju u trajanju od 10 minuta uzrokuje najveće strukturne promjene polipeptidnih lanaca koje rezultiraju većom dostupnosti peptidnih veza i posljedično većim intenzitetom obojenja otopine nakon biuret-reakcije.

Dobiveni rezultati važni su u kontekstu umjetnih izvora UV-zračenja, poput UV-lampi za nokte koje su korištene u ovom istraživanju. Istraživanja Zhivaguija i sur. (2023) pokazala su da takve lampe mogu uzrokovati oksidativna oštećenja i mutacije u stanicama, što dodatno potvrđuje opravdanost korištenja ovog izvora UV-zračenja kao modela stvarne izloženosti ljudi. Ovi nalazi nadovezuju se na uvodni dio rada koji ističe rizike svakodnevnih, često zanemarenih izvora UV-zračenja.

ANOVA test nije pokazao statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima lume između uzoraka izloženih različitim vremenima UV-zračenja ($p = 0,696$) što se može objasniti velikom varijabilnošću u dobivenim podatcima. Ta varijabilnost vjerojatno je posljedica ograničene preciznosti korištene metode. RGB vrijednosti izmjerene mobilnom aplikacijom nisu bile potpuno jednake pri svakom mjerenju, no upravo je zato provedeno ukupno 25 mjerenja za svaki uzorak kako bi se smanjila pogreška mjerenja. Za veću točnost bilo bi potrebno koristiti precizniju metodu, poput spektrofotometrije, koja nije bila dostupna u školskim laboratorijskim uvjetima.

Unatoč ograničenjima, poput korištenja hidroliziranog kolagena, nedostatka spektrofotometra i pojednostavljenih uvjeta, ovo istraživanje pokazuje da je moguće u školskim laboratorijskim uvjetima eksperimentalno prikazati utjecaj UV-zračenja na proteinsku strukturu i dostupnost peptidnih veza. Rezultati podupiru temeljnu ideju rada da UV-zračenje ima važnu ulogu u procesima fotostarenja, a ujedno otvaraju mogućnosti za buduća istraživanja, primjerice usporedbu UVA- i UVB-zračenja, primjenu antioksidansa ili korištenje drugih analitičkih metoda.

ZAKLJUČCI

- Izlaganje otopine kolagena UV-zračenju dovodi do promjena u dostupnosti peptidnih veza unutar proteinskih lanaca.
- Intenzitet ljubičastog obojenja otopine kolagena smanjivat će se pri vrlo kratkom izlaganju otopine UV-zračenju (< 5 minuta) i izlaganju dužem od 10 minuta.
- Izlaganje otopine kolagena u intervalu od 5 do 10 minuta uzrokuje najveću razliku u intenzitetu obojenja otopine kolagena, no za razliku od ostalih intervala intenzitet obojenja otopine

kolagena raste što možemo objasniti povećanjem dostupnosti peptidnih veza uzrokovanih razmicanjem polipeptidnih lanaca

- Dulje izlaganje otopine kolagena UV-zračenju (15–25 minuta) dovodi do slabljenja ljubičastog obojenja, što upućuje na kumulativne promjene u dostupnosti peptidnih veza.

LITERATURA

Adnan M. 2023. Study on determination of muscle protein by Biuret method and preparation of standard curve. Marine Fisheries Journal of Marine Fisheries Technology and Management 4: 4.

Bar M., Valiukevičienė S. 2025. Skin aging and type I collagen: A systematic review of interventions with potential collagen-related effects. Cosmetics 12(4): 129.

Diffey B. L. 2002. Sources and measurement of ultraviolet radiation. Methods 28(1): 4–13.

Fisher G. J., Wang Z. Q., Datta S. C., Varani J., Kang S., Voorhees J. J. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. The New England Journal of Medicine 337(20): 1419–1428.

Guo J., Huang X., Dou L., Yan M., Shen T., Tang W., Li J. 2022. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. Signal Transduction and Targeted Therapy 7: 391.

Holick M. F. 2004. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. The American Journal of Clinical Nutrition 80(6): 1678S–1688S.

International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). 2004. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). Health Physics 87(2): 171–186.

International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). 2010. ICNIRP statement on ultraviolet radiation exposure from sunbeds. Health Physics 99(4): 666–684.

Kammeyer A., Luiten R. M. 2015. Oxidation events and skin aging. Ageing Research Reviews 21: 16–29.

Lee S., Kim J., Park H. 2021. Skin aging is a complex process influenced by intrinsic and extrinsic factors. International Journal of Molecular Sciences 22(22): 12489.

Ricard-Blum S. 2011. The collagen family. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3(1): a004978.

Shoulders M. D., Raines R. T. 2009. Collagen structure and stability. Annual Review of Biochemistry 78: 929–958.

Sikirica M. 2018. Zbirka kemijskih pokusa za osnovnu i srednju školu, Školska knjiga, Zagreb, 2. izdanje, str. 673–674.

Telestream. 2017. Different Color Spaces – or How Levels Go Wrong, https://www.telestream.net/pdfs/whitepapers/wp-Different-Color-Spaces-QC.pdf, pristupljeno 17.11.2025.

Vierkötter A., Krutmann J. 2012. Environmental influences on skin aging and ethnic variations. Dermato-Endocrinology 4(3): 227–231.

Zhivagui M., Hoda A., Valenzuela N., Yeh Y.-Y., Dai J., He Y., Nandi S. P., Otlu B., Van Houten B., Alexandrov L. B. 2023. DNA damage and somatic mutations in mammalian cells after irradiation with a UV-nail polish dryer. Nature Communications 14(1): 276.