



Znanstvenik u meni

Originalni istraživački rad

Jan Špiclin, 4. razred

Prva gimnazija Varaždin, Varaždin
Mentori: *Marko Šafran, Tihana Čus Slatković*

Utjecaj fenola iz ekstrakta zelenog matcha čaja na smanjenje stope oštećenja DNA molekule iz sperme lososa uslijed izlaganja UV-A zračenju





Sadržaj

SAŽETAK.....	3
UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME	3
METODE RADA	7
REZULTATI	12
RASPRAVA	16
ZAKLJUČCI.....	19
LITERATURA.....	20



SAŽETAK

Svi se tijekom života izlažemo sunčevoj radijaciji, čiji dio je i UV-A zračenje koje duljim izlaganjem uzrokuje oštećenja DNA molekula. U tu svrhu ljudi koriste kreme za sunčanje čiji kemijski spojevi apsorbiraju UV zrake i na taj način štite DNA molekule u koži. Međutim, često su sami spojevi koji to rade štetni za zdravlje. S obzirom na to da je poznato da fenoli jako dobro apsorbiraju UV zrake, cilj ovog istraživanja bio je ispitati hoće li izolirani fenoli iz matcha praha utjecati na smanjenje stope oštećenja DNA molekule iz sperme lososa uslijed izlaganja UV-A zračenju u vremenu od 0 do 30 minuta. Kako bi se odredila koncentracija ukupnih fenola, korišten je FC reagens, a uz pomoć uz pomoć galne kiseline izrađena je baždarna krivulja u čiju se jednadžbu pravca uvrstila spektrofotometrijski dobivena apsorbancija na valnoj duljini od 765,1 nm. Stopa oštećenja fragmenata DNA molekula iz sperme lososa kvantificirana je uz pomoću gel elektroforeze. U istraživanju postoje četiri eksperimentalne skupine: denaturirani i nendenaturirani fragmenti DNA molekula iz sperme lososa u otopini i bez otopine fenola. Ne postoji statistički značajna razlika unutar nijedne eksperimentalne skupine, ali niti između denaturiranih fragmenata DNA molekula izlaganih 30 minuta UV-A zračenju u otopini i onih izvan otopine fenole. Na temelju svih rezultata ne može se sa sigurnošću tvrditi štiti li ekstrakt matcha čaja od UV-A zračenja. Iz tog razloga potrebno je provesti daljnja istraživanja korištenjem drugih metoda denaturacije i vizualizacije DNA molekule.

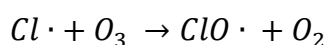
Ključne riječi: *ukupni fenoli, matcha prah, gel elektroforeza, UV-A, DNA iz sperme lososa*

UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME

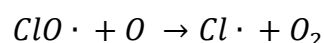
Gdje god se nalazili, svi se tijekom života izlažemo sunčevu zračenju. Sunčevo zračenje čine elektromagnetski valovi podijeljeni u 3 područja: ultraljubičaste zrake, bijela svjetlost (područje vidljive svjetlosti) i infracrvene zrake (Labor i Zelenko Paduan, 2021). Valne duljine ultraljubičastih zraka manje su od valnih duljina vidljivog dijela spektra. Valne duljine UV zraka veličine su od 100 do 400 nm. UV zrake dijele se na UV-A, UV-B i UV-C. UV-A zrake imaju najveće valne duljine (315 - 400 nm), zatim UV-B (280 - 315 nm) i najmanje valne duljine imaju UV-C zrake (100 - 280 nm) (Gaughan, 2017). U skladu s Planckovom kvantnom teorijom valna duljina je u obrnuto proporcionalnom odnosu s frekvencijom zračenja i energijom fotona (Habuš i sur. 2021). Prema tome, što je valna duljina elektromagnetskih valova manja, njihova će energija biti veća. Ultraljubičaste zrake uzrokuju lomove DNA molekule te tako nastaju mutacije (Lynch i Pergolizzi, 2010). Osim toga, UV zračenje uzrokuje mnoge bolesti poput melanoma, mrežnice, sljepilo i slabljenje imunološkog sustava (Habuš i sur., 2021). Zbog negativnog učinka UV zraka na DNA molekulu život se prvo razvio u vodi, a na kopno je prešao tek nakon što je nastao ozonski omotač koji apsorbira dio UV zraka koje na Zemlju dolaze sa Sunca (Bendelja i sur., 2021). Ozonski omotač na mjestima gdje nije oštećen apsorbira oko 90 % UV zraka koje dolaze iz svemira na Zemlju (Gaughan, 2017). U 20. st. masovno su u uređajima za zamrzavanje upotrebljavani plinovi freoni ($CFCl_3$) koji oštećuju ozonski omotač i stvaraju tzv. *ozonske rupe* (Habuš i sur., 2021). *Ozonske rupe* naziv je za dijelove ozonskog sloja koji je tanji i propušta više UV zraka. Molekule freona stabilni su halogenalkani koji apsorbiraju zračenje valne duljine 190 – 225 nm koje uzrokuje cijepanje kovalentnih veza i oslobađanje atoma klora.



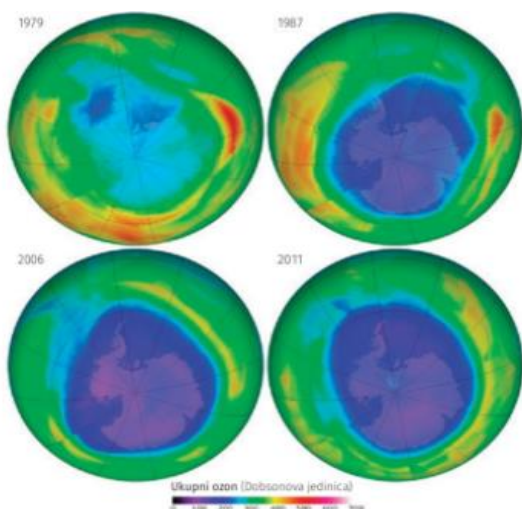
Atomi klora reagiraju s molekulom ozona i zatim nastaje kisik i vrlo reaktivan klorov(II) oksid.



Klorov(II) oksid odmah reagira s atomom kisika te tako ponovno nastaje klor, a reakcije se dalje odvijaju ciklički uništavajući ozonski sloj (Habuš i sur., 2021)

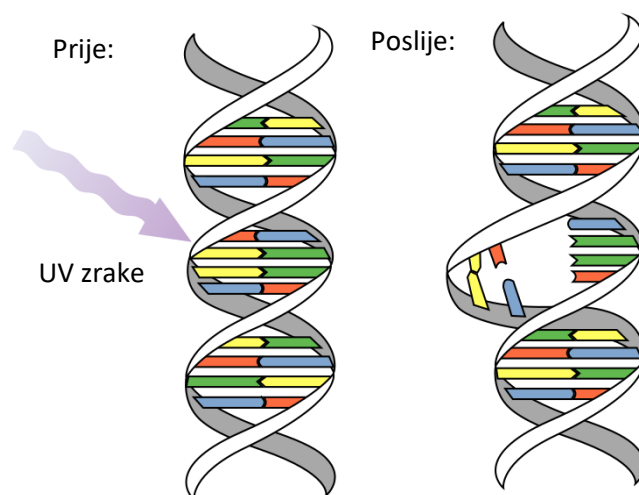


Na slici 1. prikazana je *ozonska rupa* iznad Antarktike od 1979. godine do 2011. godine. *Ozonska rupa* iznad Antarktike stalno se povećava što omogućuje ulaz UV zraka u atmosferu. UV zrake u interakciji s molekulama DNA pokidaju vodikove veze između timina i adenina u antiparalelnim lancima molekule DNA, a nakon toga molekula timina napravi kemijsku vezu s drugom molekulom timina u istom lancu (slika 2). Zbog toga, kasnije nastaju greške pri prepisivanju koda na molekulu mRNA, a rezultat su disfunkcionalni proteini (Cefali i sur., 2016). Zbog apsorpcije UV zračenja u ozonskom omotaču Zemljine atmosfere, UV zračenje iz UV-A raspona (do 95 %) i dijelom iz UV-B raspona dopire do Zemlje. Vidljivo svjetlo i infracrveno zračenje spoznajemo osjetilima, ali UV zračenje ne. Njegovo djelovanje može se vidjeti nakon kratkog ili dužeg vremena kao štetno djelovanje na našu kožu i oči (Isemura, 2019).



Slika 1. Prikaz promjene oblika i veličine ozonske rupe iznad Antarktike kroz tridesetak godina

Izvor: Habuš A. i sur. 2021. Kemija 4 – udžbenik kemije za četvrti razred gimnaziije. Profil Klett. Zagreb.



Slika 2. Jednolančani lomovi molekule DNA u interakciji s UV zrakama

Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_UV_mutation.svg, pristupljeno: 27.1.2022.

Općenito, UV-B zračenje ima poznatije akutne učinke na kožu, kao što su tamnjenje, opekline i oštećenja DNA koja mogu dovesti do raka kože nego UV-A zračenje. UV-A zračenje je vjerojatno glavni razlog preranog starenja kože, a dokazana je i njegoova uloga u nastanku raka kože (Gaughan, 2017). To je razlog zašto se ljude poziva da prilikom izlaganja sunčevom zračenju, koriste zaštitne kreme koje apsorbiraju UV zrake i sprječavaju oštećenja DNA molekula. Međutim, i same kreme mogu biti štetne, pogotovo ako sadržavaju kemijski spoj paraben za koji se sve više nagađa kako može imati kancerogena svojstva (Sharad, 2019). S obzirom na dosad iznesene podatke, javlja se osobna motivacija za istraživanje, a ona glasi: „Postoji li alternativni način zaštite od UV-A zračenja koji će biti jednako učinkovit, a istovremeno neće biti štetan?“

Fenoli su najviše istraživani spojevi sa svojstvima zaštite od sunčeva UV zračenja, a najveći udio istraživanih fenola pripada skupini flavonoida. To su polifenolni spojevi koje sintetiziraju biljke putem fenilpropanoidnog metaboličkog puta i predmet su značajnog znanstvenog interesa (Cefali i sur., 2016). Kvercetin (3,4-dihidroksiflavonol) i rutin (kvercetin-3-O- β -rutinozid) su najčešće proučavani flavonoidi. Flavonoidi ne samo da imaju antioksidativni i antikancerogeni potencijal, nego također koriste za mokraćni, kardiovaskularni i probavni sustav. Razine flavonoida u hrani uvjetovane su genima; međutim, na njih utječu i abiotički čimbenici kao što su godišnje doba, klima, sastav tla, stupanj zrelosti biljaka, način pripreme hrane, prerada i skladištenje (Isemura, 2019). Prisutnost aromatičnih prstenova u molekularnoj strukturi flavonoida daje im sposobnost apsorpiranja UV zračenja između 200 i 400 nm, što ih čini prikladnim za korištenje kao sredstva za zaštitu od sunca (Cefali i sur., 2016). Biljka koja obiluje flavonoidima jest čajevac (*Camellia sinensis*) iz kojeg se radi matcha čaj (listovi se usitnjavaju i dobiva se prah) iz kojeg se mogu raditi kreme. Čajevac iz kojeg se kasnije radi matcha mora se 30 dana prije branja čuvati od izravnog sunčevog zračenja kako bi imao više klorofila (Kochman i sur., 2020).

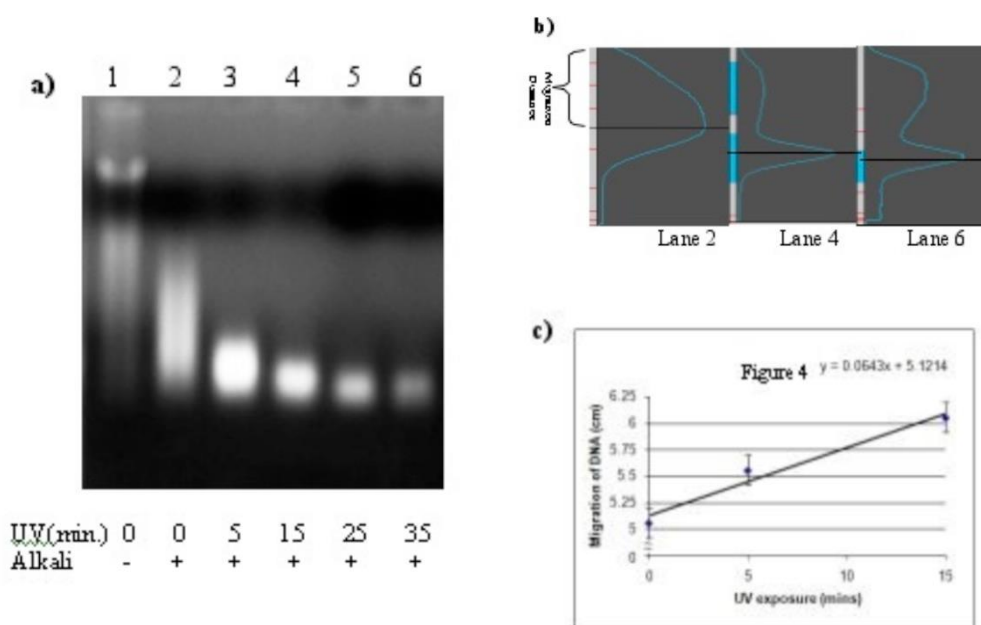
Za ovo istraživanje odabrana je DNA molekula izolirana iz sperme lososa zato što je za nju točno poznata molekulaska masa, a na tržištu se može kupiti u liofiliziranom obliku (Sigma, D1501). Također, ona je korištena u sličnim istraživanjima ispitivanja utjecaja UV-A zračenja na stopu oštećenja DNA molekule (Lynch i Pergolizzi, 2010). Nova istraživanja DNA molekule izolirane iz sperme lososa pokazala su da ona može apsorbirati UV zrake koje dolaze sa Sunca pa se potencijalno u budućnosti ona može stavljati u kreme za sunčanje što je posebno zanimljiva činjenica za ovo istraživanje i dodatni je razlog zašto je odabrana upravo ta DNA molekula (www.nationalgeographic.rs, 2017).

Cilj ovog istraživanja je ispitati hoće li fenoli izolirani iz matcha praha (*Camellia sinensis*) utjecati na smanjenje lomova DNA molekula izoliranih iz sperme lososa izlaganih UV svjetlosti valne duljine 365 nm kroz intervale od 5 do 30 minuta. Istraživačko pitanje glasi: „**Kako će molekule fenola izolirane iz matcha čaja utjecati na stopu oštećenja molekule DNA izolirane iz sperme lososa izlagane UV-A zračenju kroz različite vremenske intervale?**“

Na temelju do sada iznesenih činjenica, postavljaju se sljedeće hipoteze:

1. DNA molekule iz sperme lososa koje će biti u otopini fenola pokazat će manju stopu oštećenja od DNA molekula iz sperme lososa, vremenski isto izlaganih UV-A zračenju, koje se nisu nalazile u otopini fenola.
2. Molekule DNA izolirane iz sperme lososa koje će biti izlagane UV-A zračenju kraće vrijeme pokazat će manju stopu oštećenja od molekula DNA izoliranih iz sperme lososa koje će biti izlagane duže vrijeme.

Metodologija istraživačkog rada temelji se na znanstvenom radu „*In vitro Method to Quantify UV mediated DNA Damage*“ (Lynch i Pergolizzi, 2010). U njemu je po prvi puta primijenjena jednostavna metoda bazirana na gel elektroforezi u svrhu kvantifikacije razine DNA oštećenja uslijed izlaganja UV-A svjetlosti. Autori su pokazali kako postoji jasna pozitivna korelacija između udaljenosti koju fragmenti (sredina regije najjačeg intenziteta) tretirane DNA prijeđu prilikom gel elektroforeze i vremena kojem su bili izloženi UV-A zračenju (Slika 3.a i 3.b). Važno je napomenuti kako doza zračenja korištena u eksperimentu u najvećoj mjeri ne uzrokuje dvolančane lomove DNA molekule. Iz tog razloga, DNA je potrebno denaturirati (bazično okruženje) neposredno prije gel elektroforeze. To će dovesti do pucanja vodikovih veza između dva komplementarna lanca DNA molekule i na taj će način učinak UV-A zračenja biti jasniji (detekcija jednolančanih lomova unutar DNA molekule).



Slika 3. a) Prikaz prijeđene udaljenosti DNA fragmenata ovisno o vremenu njihovog izlaganja UV-A svjetlosti; b) Programaska analiza signala i određivanje regije najjačeg intenziteta; c) Grafički prikaz korelacije prijeđene udaljenosti DNA fragmenata i vremena izlaganja UV-A zračenja. (Slike su preuzete iz znanstvenog rada - Lynch i Pergolizzi, 2010)

METODE RADA

Koristeći spoznaju o utjecaju denaturacije DNA molekula u lužnatoj sredini i utjecaju UV-A zračenja na denaturirane DNA molekule, moguće je razviti metodu u kojoj se aktivni sastojci dodaju u radnu otopinu DNA i određuje pružaju li oni zaštitu DNA molekuli od štetnog djelovanja UV-A zračenja (primarno na nastajanje jednolančanih lomova). Ako aktivna tvar štiti od UV-A zračenja, molekula DNA će imati manje jednolančanih i dvolančanih lomova te će biti u većim fragmentima koji će uslijed razdvajanja na gel elektroforezi prijeći manji put.

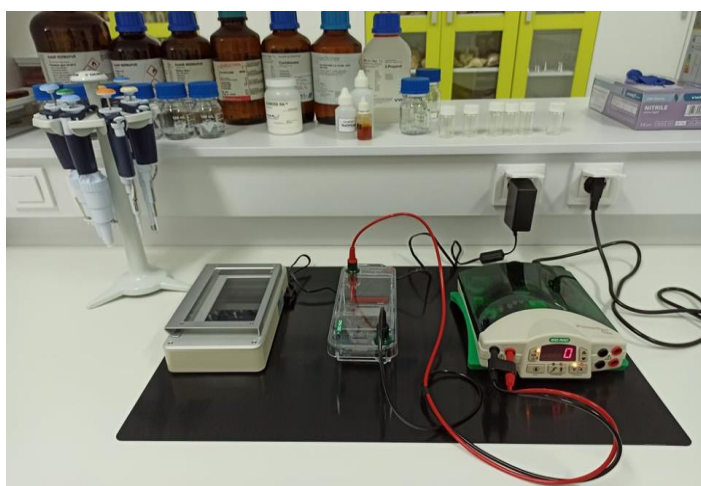
Cjelokupno istraživanje provedeno je u prostorima školskog biološkog laboratorija (Slika 4.) uz korištenje vlastite opreme i uređaja (Slika 5 - 7.).



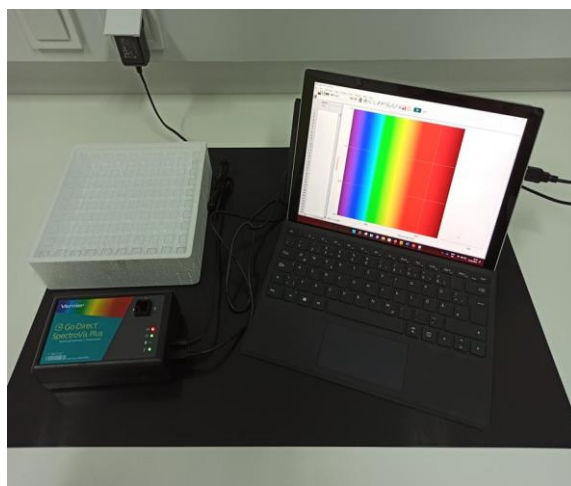
Slika 4. Školski laboratorij u kojem će biti provedeno istraživanje



Slika 5. Kutija s UV žaruljom valne duljine 365 nm u kojoj će otopine DNA iz sperme lososa biti tretirane



Slika 6. Uređaji potrebni za provođenje metode gel elektroforeze te vizualizacije DNA fragmenata (kadica za DNA elektroforezu, napajanje, UV transiluminator)



Slika 7. UV/VIS Spektrofotometar

Ovo istraživanje sastojalo se od dva koraka:

- predistraživanje kojim je istraženo u kojoj mjeri UV-A zrake valne duljine 365 nm utječu na stopu oštećenja DNA molekule iz sperme lososa
- glavno istraživanje kojim je istraženo pružaju li fenoli izolirani iz matcha čaja zaštitu molekuli DNA od oštećenja uzrokovanih UV-A zrakama.

U tu svrhu jasno su definirane varijable (Tablica 1.) i koraci potrebni za uspješno provođenje istraživanja.

Tablica 1 Popis varijabli i načina na koji su one mjerene, odnosno kontrolirane

Tip varijable	Ime varijable	Način određivanja, mjerenja i kontroliranja varijabli te razlozi njihovog odabira
Nezavisna varijabla	vrijeme izlaganja DNA molekula iz sperme lososa UV-A zračenju	DNA molekule iz sperme lososa izlagane su UV-A svjetlosti valne duljine 365 nm različitim vremenskim intervalima (5, 10, 15, 20, 25 i 30 minuta).
	koncentracija fenola koji se dodaju u otopinu DNA iz sperme lososa	DNA molekule iz sperme lososa koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$ izlagane UV-A svjetlosti bile su u otopini fenola koncentracije 300 mg/L . Potrebno je bilo ispitati najmanju moguću koncentraciju polifenola koja može apsorbirati dovoljnu količinu UV-A zračenja kako bi spriječila oštećenje DNA molekule iz sperme lososa. Fenoli su bili izolirani iz matcha praha, a njihova se koncentracija određivala spektrofotometrijski uz pomoć otopine FC reagensa i eksperimentalno izrađene baždarne krivulje s galnom kiselinom.
Zavisna varijabla	migracija DNA molekula (prijedni put)	Migracija DNA molekula mjerena je uz pomoć metode gel-elektroforeze, a gel je kasnije analiziran u besplatnom programu <i>GelAnalyzer</i> . Slike je prije analize uređena u programu <i>Digimizer</i> .
Kontrolna varijabla	DNA molekula iz sperme lososa (Sigma-Aldrich)	U svim mjerenjima korištena je DNA molekula iz sperme lososa proizvođača (Sigma, D1501) radne koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$.
	UV-A svjetlost (365 nm)	Sve DNA molekule izlagane su UV-A svjetlosti valne duljine 365 nm pod istim uvjetima (Slika 5).
	uvjeti gel elektroforeze	U svim mjerenjima gel elektroforeze korišten je 1 %-tni agarozni gel te isti napon (7 minuta 40 V i 23 minute 90 V). Optimalni vremenski raspon duljine trajanja elektroforeze i optimalni napon određeni su eksperimentalno (provedeno je više od 10 probnih elektroforeza kojima je ispitivan optimalni napon i optimalno vrijeme za očitavanje rezultata).
	matcha prah	Korišteni matcha prah nabavljen od jednog proizvođača (Biovega d.o.o.).
	sterilnost	U ovome istraživanju vrlo je važna sterilnost jer na oštećenje DNA molekula mogu utjecati mikroorganizmi, ali i enzimi koji se nalaze na našim rukama i oko nas. Za pripremu svih otopina koristi se sterilizirana deionizirana voda, sterilizirani puferi, sterilan pribor i sterilni nastavci za automatske pipete.



Koraci istraživanja

a) Priprema radne otopine DNA

Za istraživanje je odabrana DNA izolirana iz sperme lososa (Sigma, D1501). 0,01 g liofilizirane DNA molekule izvagan je na analitičkoj vagi i otopljen u 1 mL sterilne deionizirane vode kako bi se postigla stock otopina koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracija radne otopine DNA molekule je 100 $\mu\text{g/mL}$, a dobivena je tako da se stock otopina razrijedi 100 puta. Izrađena je prvo stock otopina veće koncentracije koja je kasnije razrjeđivana zato što je greška pri vaganju 0,01 g DNA molekula na analitičkoj vagi mnogo manja od vaganja 0,0001 g.

b) Izlaganje DNA molekule iz sperme lososa UV-A zračenju i njezina denaturacija

Izlaganje DNA molekula iz sperme lososa UV-A zračenju provođeno je u Eppendorf epruvetama, volumena 2 mL. U 14 epruveta dodano je 100 μL radne otopine DNA i stavljeno u prethodno izrađenu drvenu kutiju s UV žaruljom (Slika 5). Otopine DNA molekula iz sperme lososa izlagane su UV-A zračenju u prethodno navedenim vremenskim intervalima, nakon čega je 7 otopina DNA molekula tretirano otopinom za denaturaciju kako bi došlo do pucanja vodikovih veza između komplementarnih lanaca. Lynch i Pergolizzi (2010.) su pokazali kako se najbolji rezultati dobivaju primjenom denaturacijske otopine koja sadrži 0.3M NaOH i 1mM EDTA. Omjer denaturacijske otopine i otopine DNA molekula u omjeru je 1:10.

c) Gel elektroforeza tretiranih DNA otopina

Za razdvajanje fragmenata tretiranih DNA otopina iz sperme lososa korišten je 1 %-tni agarozni gel (pripremljen u 1x TBE puferu) i *Mini-Sub Cell GT* (Biorad) sustav za DNA gel elektroforezu (Slika 6). U gel je dodana Midori Green boja (15 μL boje u 30 mL gela). U 14 jažica nanesen je po jedan tretirani DNA uzorak sperme lososa koji je prethodno pomiješan s 30 %-tnim glicerolom, a u prvu je jažicu nanesen biološki marker (2.5 kb Molecular Ruler #1708205). Za vizualizaciju DNA fragmenata korišten je *Large Blue LED Transilluminator* (IO Rodeo) i kamera na mobilnom uređaju.

d) Izolacija ukupnih fenola iz zelenog matcha čaja

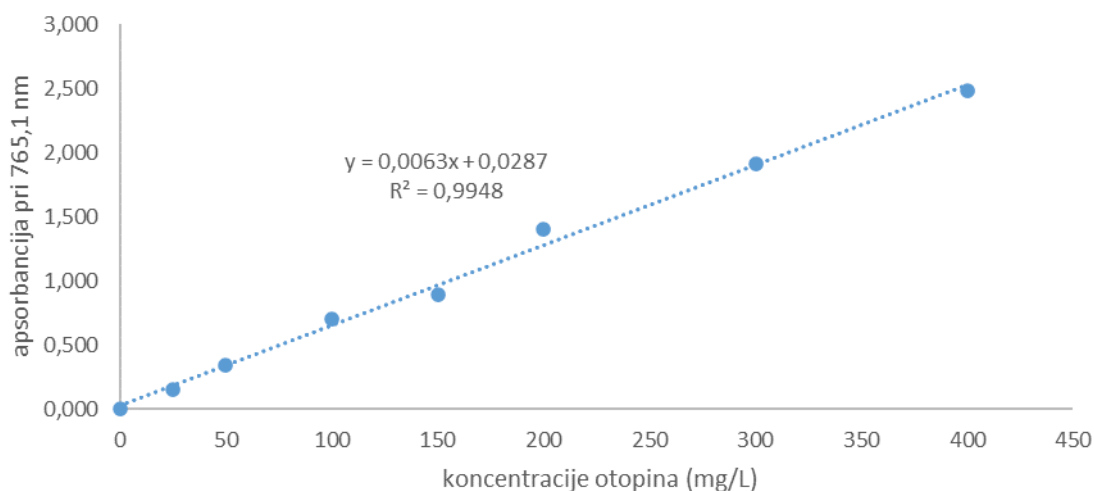
Za izolaciju ukupnih fenola iz zelenog matcha čaja korištena je metoda ekstrakcije pomoću 70 %-tnog etanola opisana od strane Lapornika i sur. (2005). Jedan gram matcha praha je otopljen u 30 mL 70 %-tnog etanola nakon čega je otopina centrifugirana na 12 000 okretaja u trajanju od 15 minuta. Fenoli se nakon centrifuge nalaze u supernatantu. Supernatant je tekućina bez krupnih čestica koja ostane iznad taloga nakon centrifuge (neistaloženi dio otopine). U svrhu daljnje analize, sadržaj supernatanta je prebačen u sterilnu Falcon epruvetu volumena 15 mL.

e) Izrada baždarnе krivulje galne kiseline – određivanje ukupnog fenolnog sastava

Koncentracija ukupnih fenola u zelenom matcha čaju određena je spektrofotometrijski (Lapornik i sur., 2005). Metoda se temelji na reakciji Folin–Ciocalteu (FC) reagensa s hidroksilnom skupinom fenolnih spojeva, što dovodi do promjene boje u plavo (pH 10). Zbog visokog pH, na signal ne utječu ostali spojevi koji bi mogli djelovati na isti način (npr. askorbinska kiselina). Apsorbancija uzoraka mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Ignat i sur., 2011).

Kako bi se apsorbancija uzoraka mogla kvantificirati i odrediti točna koncentracija fenola, izrađena je baždarna krivulja korištenjem poznatog standarda (Slika 8). U tu svrhu koriste se otopine galne kiseline poznate koncentracije. Za izradu baždarnе krivulje korištene su otopine galne kiseline koncentracija 0, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 mg/L. U 200 µL svake od otopina dodan je 1 mL deionizirane vode i 200 µL FC reagensa. Otopina nakon toga mora stajati 6 minuta, a zatim se u svaku otopinu dodaju još 2 mL 7 %-tne otopine natrijeva karbonata i 1 mL deionizirane vode. Nakon 90 minuta se očita apsorbancija na valnoj duljini od 765 nm.

Baždarna krivulja za fenole (ovisnost apsorbancije pri 765,1 nm o koncentracijama otopine galne kiseline)



Slika 8 Eksperimentalno izrađena baždarna krivulja za određivanje koncentracije ukupnih fenola

f) Priprema otopina ekstrahiranih fenola iz zelenog matcha čaja

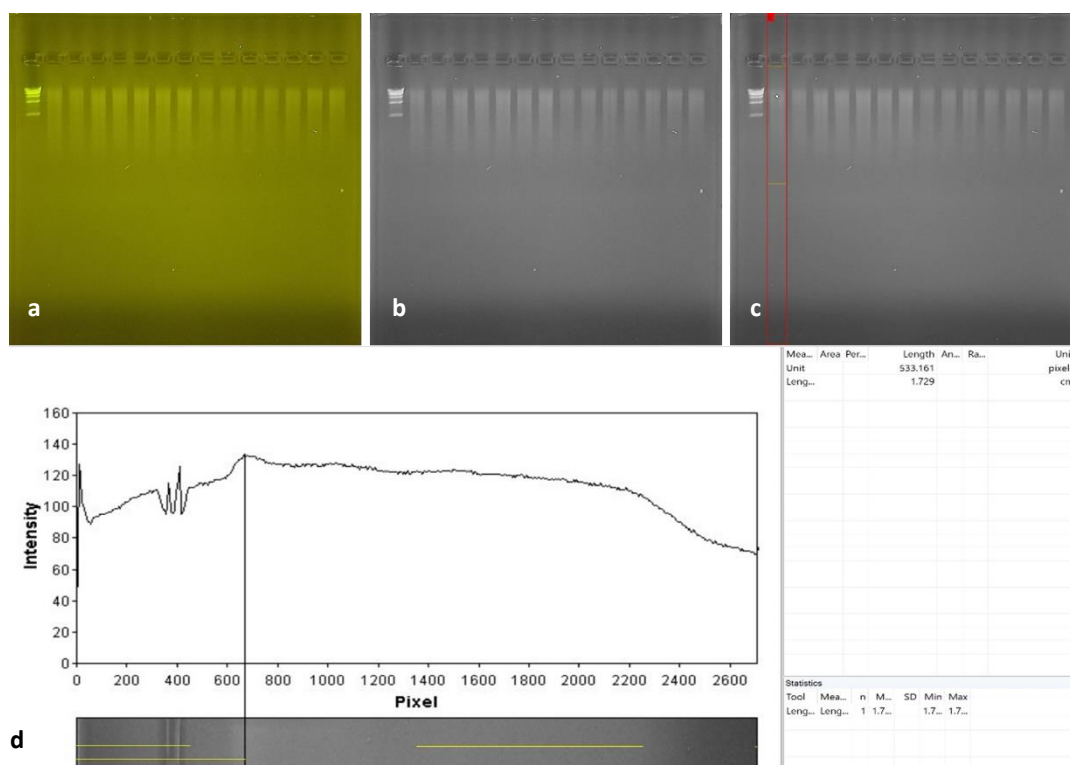
Ekstrakt matcha čaja dobiven prethodno opisanim postupkom razrijeđen je deioniziranom vodom kako bi se postigla željena koncentracija od 300 mg/L. Dobivene otopine u sljedećem su koraku dodane u radnu otopinu DNA molekula iz sperme lososa. U 100 µL otopine DNA molekula iz sperme lososa koncentracije 100 µL/mL dodano je 30 µL otopine fenola. Time se postiže omjer DNA molekula i fenola 1:1.

g) Ispitivanje svojstva ukupnih fenola iz ekstrakta matcha čaja na smanjenje stope oštećenja DNA molekula iz sperme lososa

Kao i u koraku b., izlaganje DNA molekula iz sperme lososa UV-A zračenju provođeno je u Eppendorf epruvetama. U 14 epruveta dodano je 200 μL radne otopine DNA i 30 μL otopine ekstrahiranih fenola iz matcha čaja. Uzorci su stavljeni u drvenu kutiju s UV žaruljom (Slika 5) na različite periode od 1 minute do 30 minuta. Nakon izlaganja UV zračenju provedena je denaturacija i razdvajanje DNA fragmenata gel elektroforezom na prethodno opisani način. Za svaku korištenu koncentraciju ukupnih fenola određena je udaljenost koju su DNA fragmenti prošli od početka jažice do sredine najjačeg signala i uspoređena s prethodnim mjerenjima tj. kada u otopinu DNA iz sperme lososa nije dodan ekstrakt zelenog matcha čaja.

h) Analiza fotografija gelova pomoću programa *GelAnalyzer* i *Digimizer*

Originalna fotografija gela s transluminatora (Slika 9a) najprije je prebačena u program *Digimizer* (Inačica 5.7.2, MedCalc Software Ltd., 2021) u kojem je pretvorena u crno-bijelu fotografiju (Slika 9b) kako bi se bolje istaknuli kontrasti na gelu. Dobivena crno-bijela fotografija zatim je prebačena u program *GelAnalyzer* (Inačica 19.1, Istvan, 2010) u kojem su označene staze kretanja DNA molekula iz jažica prema anodi (Slika 9c). Dobiveni graf svake pojedine staze na gelu prebačen je ponovno u program *Digimizer* u kojem je duljina staze u pikselima baždarena u duljinu izraženu u centimetrima (Slika 9d). Nakon baždarenja, u programu je određena udaljenost fragmenata DNA s točnošću od 0,001 cm.



Slika 9 Proces obrade fotografije gelova u programima *Digimizer* i *GelAnalyzer*

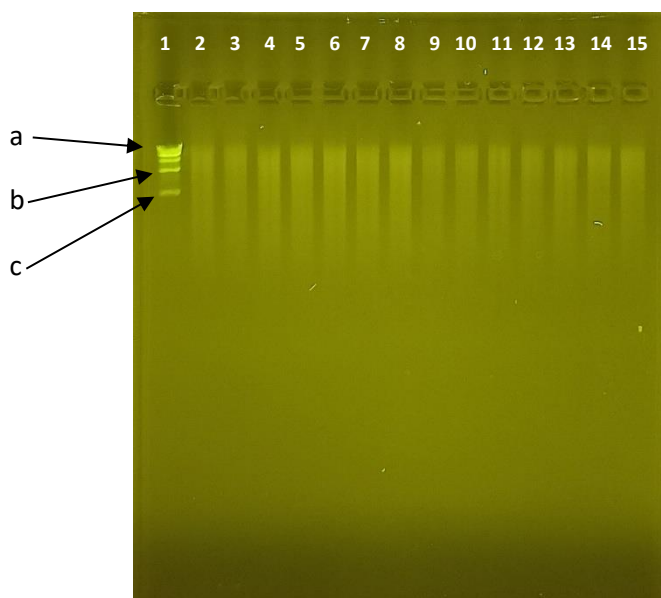
Rezultati istraživanja su statistički analizirani na sljedeći način:

- aritmetička sredina** – računanje tzv. srednje vrijednosti pet uzastopnih mjerenja prijeđene udaljenosti DNA fragmenata nakon gel elektroforeze
- standardna devijacija** – određivanje „raspršenosti“ mjerenja oko izračunate aritmetičke sredine (ako se radi o normalnoj distribuciji podataka, 68.3 % svih mjerenja nalazi se u rasponu ± 1 standardne devijacije od aritmetičke sredine)
- ANOVA test** – u svrhu određivanja je li razlika između aritmetičkih sredina eksperimentalnih grupa tj. prijeđenog puta DNA fragmenata (otopine DNA molekula iz sperme lososa koje sadrže ekstrakt fenola iz zelenog matcha čaja) značajno različita ili ne
- koeficijent korelacije (Pearson)** - određeno postoji li značajna korelacija (pozitivna ili negativna) između zavisne (stope oštećenja DNA tj. prijeđenog puta DNA fragmenata) i nezavisne (koncentracije fenola u ekstraktu matcha čaja) varijable

Pri radu u laboratoriju, poštivane su sve mjere sigurnosti (nošenje zaštitnih rukavica, naočala, kute) i piktogrami opasnosti na kemikalijama.

REZULTATI

Kvalitativna analiza gela nakon provedene elektroforeze kroz period od 30 minuta



Slika 10 Prikaz gela nakon elektroforeze:

1 – molekularni marker (a – fragmenti veličine $\geq 7,5$ kb, b – fragment veličine 5 kb, c – fragment veličine 2,5 kb); 2-8 nedenaturirani fragmenti DNA molekula iz sperme lososa izlagani UV-A zračenju: 2 – 0 minuta, 3 – 1 minutu, 4 – 5 minuta, 5 – 10 minuta, 6 – 15 minuta, 7 – 20 minuta i 8 – 30 minuta; 9-15 denaturirani fragmenti DNA molekula iz sperme lososa izlagani UV-A zračenju: 9 – 0 minuta, 10 – 1 minutu, 11 – 5 minuta, 12 – 10 minuta, 13 – 15 minuta, 14 – 20 minuta i 15 – 30 minuta.

Određivanje prijedene udaljenosti fragmenata DNA molekula iz sperme lososa izazvanih UV-A zračenjem (365 nm)

Tablica 2 Udaljenosti koje su tijekom elektroforeze na gelu prošle DNA molekule izlagane UV zračenju valne duljine 365 nm

	kontrolna skupina	0	Prijedena udaljenost DNA fragmenta od početka jažice do sredine najjačeg signala/cm		
			broj ponavljanja		
			1	2	3
Bez dodavanja fenolnog ekstrakta	Vrijeme izlaganja UV-A zračenju/min	0	1,73	1,772	1,788
		1	1,755	1,741	1,759
		5	1,738	1,8	1,802
		10	1,698	1,803	1,786
		15	1,724	1,764	1,739
		20	1,736	1,809	1,802
		30	1,723	1,778	1,8

Tablica 3 Udaljenosti koje su tijekom elektroforeze na gelu prošle denaturirane DNA molekule izlagane UV zračenju valne duljine 365 nm

	kontrolna skupina	0	Prijedena udaljenost DNA fragmenta od početka jažice do sredine najjačeg signala/cm		
			broj ponavljanja		
			1	2	3
Bez dodavanja fenolnog ekstrakta; DENATURIRANO	Vrijeme izlaganja UV-A zračenju/min	0	1,742	1,729	1,82
		1	1,723	1,748	1,758
		5	1,816	1,726	1,797
		10	1,741	1,752	1,768
		15	1,729	1,766	1,844
		20	1,741	1,763	1,748
		30	1,758	1,822	1,818

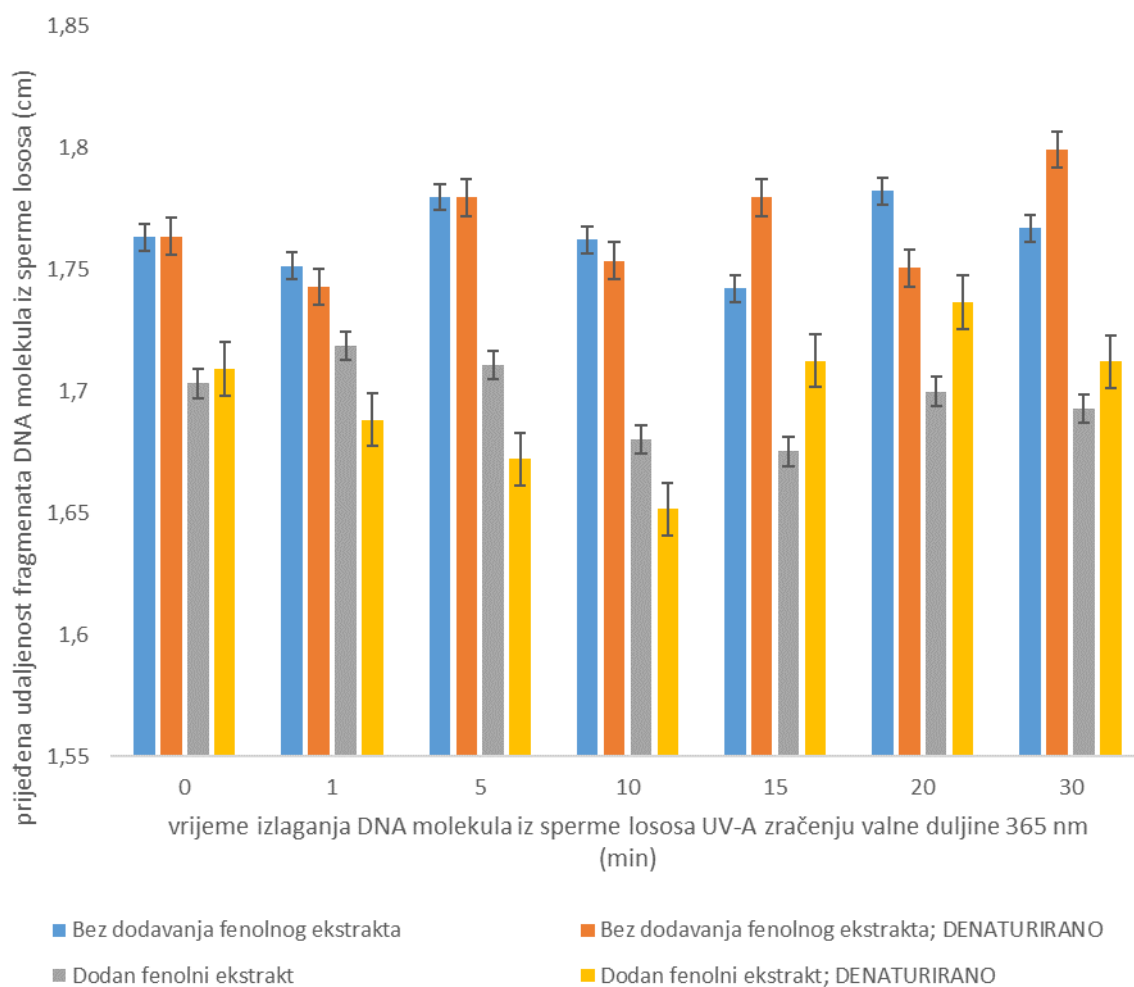
U Tablicama 3 i 4 prikazani su rezultati gel elektroforeze za denaturirane i nendenaturirane molekule DNA iz sperme lososa koje nisu imale nikakvu zaštitu od UV-A zračenja, a u tablicama 4 i 5 prikazani su rezultati gel elektroforeze za denaturirane i nendenaturirane molekule DNA iz sperme lososa koje su se nalazile u otopini fenola koncentracije 300 mg/L.

Tablica 4 Udaljenosti koje su tijekom elektroforeze na gelu prošle DNA molekule u otopini fenola izlagane UV zračenju valne duljine 365 nm

	kontrolna skupina	0	Prijedena udaljenost DNA fragmenta od početka jažice do sredine najjačeg signala/cm		
			broj ponavljanja		
			1	2	3
Dodan fenolni ekstrakt	Vrijeme izlaganja UV-A zračenju/min	0	1,635	1,745	1,73
		1	1,659	1,781	1,716
		5	1,631	1,747	1,755
		10	1,564	1,759	1,718
		15	1,61	1,729	1,687
		20	1,66	1,747	1,693
		30	1,641	1,732	1,706

Tablica 5 Udaljenosti koje su tijekom elektroforeze na gelu prošle DNA molekule u otopini fenola izlagane UV zračenju valne duljine 365 nm

	kontrolna skupina	0	Prijedena udaljenost DNA fragmenta od početka jažice do sredine najjačeg signala/cm		
			broj ponavljanja		
			1	2	3
Dodan fenolni ekstrakt; DENATURIRANO	Vrijeme izlaganja UV-A zračenju/min	0	1,674	1,738	1,716
		1	1,662	1,735	1,668
		5	1,613	1,712	1,692
		10	1,551	1,724	1,68
		15	1,624	1,767	1,747
		20	1,662	1,81	1,738
		30	1,641	1,748	1,748



Slika 11 Ovisnost vremena izlaganja i denaturacije DNA molekule iz sperme lososa s i bez prisustva fenola na prijeđeni put fragmenata u gelu tijekom elektroforeze kroz 30 minuta

ANOVA testom je utvrđeno da ne postoji niti jedna statistički značajna razlika u varijabilnosti između eksperimentalnih skupina DNA molekula koje nisu denaturirane (F vrijednost = 0,472, F crit vrijednost 2,848, p vrijednost = 0,818), ali niti između eksperimentalnih skupina DNA molekula koje su denaturirane (Tablica 6). Također, ANOVA testom je utvrđeno da ne postoji niti jedna statistički značajna razlika između eksperimentalnih skupina DNA molekula koje nisu denaturirane (F vrijednost = 0,169, F crit vrijednost 2,848, p vrijednost = 0,981), ali niti između eksperimentalnih skupina DNA molekula koje jesu denaturirane (Tablica 6).

Iako ne postoje statistički značajne razlike u varijabilnosti unutar eksperimentalnih skupina, potrebno je testirati postoji li možda značajna razlika u varijabilnosti između dviju eksperimentalnih skupina (denaturirane DNA molekule iz sperme lososa u otopini i bez otopine fenola). U tu svrhu proveden je Studentov test (t -test) u kojem su korištene prijeđene udaljenosti fragmenata DNA molekula iz sperme lososa nakon 30 minutnog izlaganja UV-A zračenju. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u varijabilnosti između dviju skupina (t vrijednost = 2,109, t crit = 2,353, p vrijednost = 0,063).

**Tablica 6** ANOVA test dobivenih rezultata za denaturirane molekule DNA iz sperme lososa

	F vrijednost	F crit	p-vrijednost
Denaturirane DNA molekule iz sperme lososa bez dodatka fenola	0,836	2,848	0,562
Denaturirane DNA molekule iz sperme lososa u otopini fenola	0,600	2,848	0,726

Određivanje koncentracije ukupnih fenola iz ekstrakta matcha praha

Mjerenja apsorbancije ekstrakta matcha praha (1 g u 30 mL) pokazivala su vrijednosti veće od 3,00 koje spektrofotometar ne može očitati. Stoga je početni ekstrakt matcha praha razrijeđen 10 puta. Točna koncentracija ukupnih fenola u uzorku izračunata je pomoću jednadžbe grafa eksperimentalno izrađene baždarne krivulje (Slika 8).

Jednadžba grafa baždarne krivulje:

$y = 0,0063x + 0,0287$, gdje je y očitana apsorbancija, a x nepoznata vrijednost koncentracije ukupnih fenola u uzorku.

Iz toga slijedi:

$$x = \frac{y - 0,0287}{0,0063}$$

Tablica 7 Mjerenje vrijednosti apsorbancije uzoraka matcha praha pri valnoj duljini od 765,1 nm i određivanje koncentracije ukupnih fenola pomoću eksperimentalno izrađene baždarne krivulje

Dan mjerenja	Apsorbancija pri 765,1 nm	Srednja vrijednost apsorbancija	Standardna devijacija	Koncentracije ukupnih fenola u uzorku (mg/L ekvivalenta galne kiseline)
1. dan	1,953	2,13275	0,1207321	343,0873016
	2,172			
	2,201			
	2,205			
2. dan	2,037	2,1225	0,0570701	341,4603175
	2,149			
	2,149			
	2,155			
8. dan	2,087	2,13875	0,0348748	344,0396825
	2,163			
	2,151			
	2,154			
13. dan	1,939	2,112	0,1239866	339,7936508
	2,136			
	2,139			
	2,234			

RASPRAVA

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ne poklapaju se u potpunosti s hipotezama iznesenim na temelju znanstvenih činjenica pronađenih u literaturi, no istražuje se biološki sustav koji je vrlo nepredvidiv te postoji mnogo parametara koji mogu utjecati na konačni rezultat dobiven nekim mjerenjem. Naime, u originalnom radu Lynch i Pergolizzi (2010.) su dokazali negativnu korelaciju između povećanja vremena izlaganja denaturiranih fragmenata DNA molekula iz sperme lososa i duljine prijađenog puta na gelu.

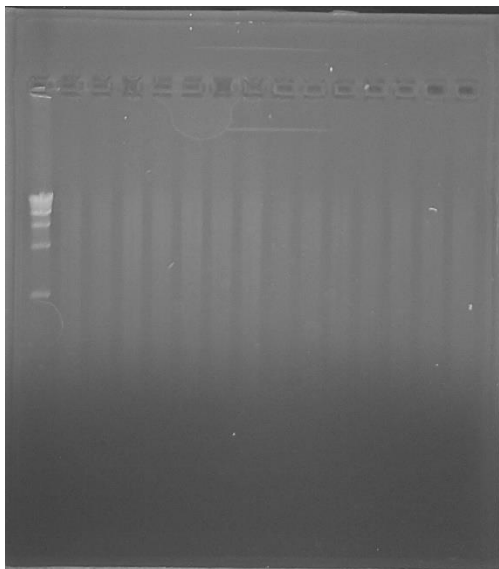
Činjenica da se početna 3 %-tna otopina matcha praha morala 10 puta razrjeđivati kako bi se uopće mogla očitati apsorbancija i izračunati koncentracija ukupnih fenola, govori u prilog njihovoj vrlo visokoj koncentraciji u matcha prahu. Koncentracija ukupnih fenola mjerena je kontinuirano u periodu od 13 dana kako bi se vidjelo dolazi li s vremenom do njihove razgradnje i promjene strukture. Otopina s fenolima kroz taj je period konzervirana u hladnjaku na 4 °C. Koncentracija fenola se kroz 13 dana nije nimalo smanjila, što se poklapa s rezultatima istraživanja Coelha i sur., 2020. Naime, oni su pokazali da koncentracija ukupnih fenola matcha praha ostaje stalna vrlo dugi vremenski period, a počinje padati tek nakon 2 tjedna izlaganja svjetlosti. S obzirom na to da su Cefali i suradnici 2016. godine dokazali da fenoli apsorbiraju UV zrake i pružaju zaštitu od UV zračenja, matcha prah je tvar koja bi se potencijalno mogla koristiti kao zaštita od istog. Za konkretnu primjenu i djelotvornost ekstrakta matcha praha potrebna su daljnja istraživanja, posebno u *in vivo* uvjetima jer su Farrar i sur. 2015. kroz kliničko testiranje u trajanju od 3 mjeseca pokazali kako katehini iz zelenog čaja ne pružaju adekvatnu



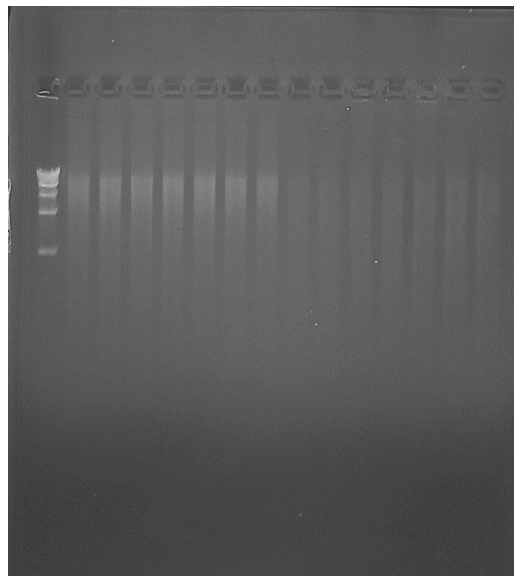
zaštitu od pojave kožnih opeklini uzrokovanih sunčevim UV zračenjem, iako se kroz *in vitro* istraživanje to pokazalo istinitim.

Rezultati gel elektroforeze pokazali su u svim eksperimentalnim skupinama gotovo jednake rezultate jer se vrijednosti prijeđenih udaljenosti fragmenata DNA molekula iz sperme lososa kreću u vrlo uskom rasponu od 1,6 do 1,9 cm. ANOVA testom je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika u varijabilnosti unutar eksperimentalnih skupina, a t-test da ne postoji ni statistički značajna razlika u varijabilnosti između prijeđenog puta denaturiranih fragmenata DNA molekula iz sperme lososa tretiranih 30 minuta UV-A zračenjem u otopini fenola i onih koji nisu bili u otopini fenola. Razlog odabiru upravo tih dviju skupina počiva u pretpostavci da će nakon najduljeg vremena izlaganja doći do najvećeg oštećenja DNA molekule pa ako postoje značajne razlike između skupina, one će biti najizraženije nakon najduljeg izlaganja. Iz gore navedenih razloga zaključuje se da inicijalne hipoteze nisu potvrđene. Mogući razlozi za takav rezultat su prekratko trajanje elektroforeze, omjer fragmenata DNA molekula iz sperme lososa i pufera za denaturaciju 10:1, preslaba koncentracija NaOH u puferu (0,3 mol/L), a nije isključena niti ljudska pogreška prilikom pipetiranja, održavanja sterilne okoline i ostalih važnih postupaka pri radu. Elektroforeza je trajala 30 minuta i od toga 7 minuta je napon bio 40 V, a 23 minute 90 V. Razlog vremenske ograničenosti od 30 minuta je korištenje alkalne otopine kao sredstva za denaturaciju DNA molekula. Već nakon 30 minuta elektroforeze došlo je do nepovratnog gubitka fluorescencijskog signala denaturiranih fragmenata DNA molekula iz sperme lososa (Slika 12 i 13). Najvjerojatniji razlog tome je reakcija natrijeve lužine s Midori Green bojom za vizualizaciju DNA molekula. Naime, u svojem radu, Lynch i Pergolizzi (2010.) su kao fluorescencijsku boju koristili etidij bromid, koji se za razliku od Midori Green boje interkalira između dušičnih baza DNA molekula te je time sama veza između boje i DNA molekule snažnija. Isprobana su 3 načina bojenja gela: dodavanje boje u tekući gel nakon kuhanja, dodavanje boje u jažicu zajedno s fragmentima DNA molekula iz sperme lososa i bojenje gela naknadno nakon elektroforeze. Pokazalo se da je signal na transiluminatoru najjači ako se boja doda u tekući gel nakon kuhanja. Koncentracija NaOH od 0,3 mol/L te omjer DNA molekula iz sperme lososa i pufera za denaturaciju 10:1 mogući su razlozi da se veći dio fragmenata DNA molekula iz sperme lososa nije denaturirao pa su rezultati zato približno jednaki rezultatima nendenaturiranih fragmenata DNA molekula iz sperme lososa. Bez obzira na nemogućnost produljenja trajanja gel elektroforeze u navedenim uvjetima, promjena metode denaturacije DNA molekula nije bila razmatrana jer metode poput izlaganja visokoj temperaturi i drugim kemijskim tvarima (formamid, DMSO itd.) dovode do visoke stope renaturacije.

Daljnja istraživanja na tu temu svakako bi trebala uzeti u obzir navedene pogreške. Povećanje vremena trajanja elektroforeze i povećanja koncentracije NaOH moguće je napraviti ako se za elektroforezu koristi bojenje bojom koja ne reagira s lužinom, npr. etidij bromid. U takvim istraživanjima potrebno je posebnu pozornost posvetiti sigurnosti, s obzirom na to da je etidij bromid karcinogena i mutagena tvar.



Slika 12 Gel s fragmentima DNA molekula iz sperme lososa nakon 60 minuta elektroforeze



Slika 11 Gel s fragmentima DNA molekula iz sperme lososa nakon 60 minuta elektroforeze



ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata donose se sljedeći zaključci:

- 3 %-tni ekstrakt matcha čaja sadrži visoku koncentraciju ukupnih fenola s prosječnom vrijednosti od 3,42 g/L ekvivalenta galne kiseline,
- ako se čuva u tami, ekstrakt matcha čaja pokazuje dugotrajnu stabilnost zbog činjenice da u 13 dana nije došlo do značajnog smanjenja koncentracije ukupnih fenola,
- denaturacija DNA molekula iz sperme lososa s pomoću 0,3M NaOH nije se pokazala uspješnom u detekciji jednolančanih lomova zato što nema značajne razlike u duljini prijeđenog puta fragmenata DNA molekula iz sperme lososa s i bez alkalne denaturacije nakon izlaganja UV-A zračenju različitog trajanja (0 – 30 min),
- zaštitno svojstvo ekstrakta matcha čaja nije eksperimentalno dokazano - ne postoji značajna razlika u varijabilnosti između prijeđenog puta denaturiranih fragmenata DNA molekula iz sperme lososa tretiranih 30 minuta UV-A zračenjem u otopini fenola i onih koji nisu bili u otopini fenola.



LITERATURA

1. Bendelja D., Durgo K., Lukša Ž., Pavlica M. 2021. *Biologija 4 – udžbenik biologije u četvrtom razredu gimnazije*. Školska knjiga, Zagreb.
2. Cefali C. L., Ataide J. A., Moriel P., Foglio M. A., Mazzola P. G. 2016. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science* 38: 346–353.
3. Coelho, K. Y., Oliveira, A. A. de, Brumano, M. H. N. ., Fidelis, P. C. 2020. Stability of total phenolic and antioxidant capacity in ready-to-drink black and green tea formulations. *Research, Society and Development*.
4. Farrar, M. D., Nicolaou, A., Clarke, K. A., Mason, S., Massey, K. A., Dew, T. P., Watson, R. E. B., Williamson, G., Rhodes, L. E. 2015. A randomized controlled trial of green tea catechins in protection against ultraviolet radiation–induced cutaneous inflammation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102: 608–615.
5. Gaughan R. 2017. What Percent of UV Does the Ozone Absorb? *Sciencing*. <https://sciencing.com/percent-uv-ozone-absorb-20509.html>, pristupljeno: 22.1.2022.
6. Habuš A., Barić Tominac M., Dragobratović A., Liber S., Kučak A., Bajić D. 2021. *Kemija 4 – udžbenik kemije za četvrti razred gimnazije*. Profil Klett, Zagreb.
7. Ignat I., Volf I., Popa V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126: 1821–1835.
8. Isemura M. 2019. Catechin in Human Health and Disease. *Molecules* 2019: 24-528.
9. Istvan L. Jr. 2010. GelAnalyzer 19.1 (računalni program). Preuzeto sa <http://www.gelanalyzer.com/index.html>.
10. Kochman J., Jakubczyk K., Antoniewicz J., Mruk H., Janda K. 2020. Health Benefits and Chemical Composition of Matcha Green Tea: A Review. *Molecules* 2021: 26-85.
11. Labor J., Zelenko Paduan J. 2021. *Fizika 4 – udžbenik iz fizike za 4. razred gimnazije*. Alfa d.d, Zagreb.
12. Lapornik B., Prošek M., Wondra Golc A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71: 214–222.
13. Lynch K., Pergolizzi R., 2010. *In vitro Method to Quantify UV mediated DNA Damage*. Bergen County Academies, Hackensack, New Jersey, 07601, USA.
14. MedCalc Software Ltd. 2021. Digimizer 5.7.2 (računalni program). Preuzeto sa <https://www.digimizer.com/contact/>.
15. Natgeo. 2017. Efikasna zaštita kože od sunčevih zraka: Krema za sunčanje od DNK sperme lososa? National Geographic Srbija. <https://nationalgeographic.rs/nauka/medicina-i-psihologija/a21662/efikasna-zastita-koze-od-suncevih-zraka-krema-za-suncanje-od-dnk-sperme-lososa.html>, pristupljeno 22.3.2022.
16. Sharad P.P. 2019. Ensuring the Safety of Sunscreens, and Their Efficacy in Preventing Skin Cancers: Challenges and Controversies for Clinicians, Formulators, and Regulators. *Front. Med.* 6: 195.