

MARCIN WIŚNIEWSKI¹⁾, ALINA SIONKOWSKA¹⁾, HALINA KACZMAREK¹⁾,
SYLVAIN LAZARE²⁾, VLADIMIR TOKAREV²⁾

Wpływ promieniowania laserowego na cienkie błony kolagenowe

Cz. II. BADANIA SPEKTROSKOPOWE STRUKTURY „MIKROPIANKI” KOLAGENOWEJ^{*)}

Streszczenie — Szczegółowo scharakteryzowano specyficzną strukturę kolagenu i na tej podstawie zinterpretowano — określony metodami spektroskopii Ramana oraz FTIR-ATR — wpływ energii i liczby impulsów lasera ekscymerowego KrF ($\lambda = 248$ nm) na uporządkowanie struktury błon kolagenowych. Stwierdzono, że napromienianie laserem powoduje zanik oddziaływań krótkiego zasięgu (wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa i hydrofobowe) oraz ubytek wody. W wyniku tych zjawisk potrójna helisa kolagenu po części przechodzi w strukturę kłębka statystycznego. Ponadto widma ramanowskie wskazują na reakcje rozmywania wiązań łańcucha głównego cząsteczek kolagenu wywołane dużą wartością energii (5 eV) fotonów zastosowanego lasera.

Słowa kluczowe: kolagen, promieniowanie laserowe, spektroskopia Ramana, spektroskopia FTIR-ATR, „mikropianka”, oddziaływania krótkiego zasięgu, potrójna helisa, kłębek statystyczny, destrukcja łańcucha.

INFLUENCE OF LASER IRRADIATION ON THE THIN COLLAGEN FILMS. PART II. SPECTROSCOPIC INVESTIGATIONS OF COLLAGEN „MICRO-FOAM” STRUCTURE

Summary — Specific structure of collagen was characterized in detail (Scheme A, B and C). On this basis the interpretation of the effects of energy and number of pulses of excimer laser KrF ($\lambda = 248$ nm) on the collagen film structure array (Fig. 1—5, Table 1) (determined by Raman and FTIR-ATR spectroscopic methods) has been done. The decay of short range interactions (hydrogen bonds, Van der Waals forces and hydrophobic interactions) as well as water loss were found. As a result of all this the triple helix of collagen partially change the structure to random coil. Additionally, the Raman spectra suggest the reactions of chain scission of collagen caused by high energy of photons (5 eV) of the laser used.

Key words: collagen, laser irradiation, Raman spectroscopy, FTIR-ATR spectroscopy, „micro-foam”, short range interactions, triple helix, random coil, chain scission.

Część I naszej publikacji [1] dotyczyła warunków oraz mechanizmu powstawania „mikropiankowej” warstwy na powierzchni błon kolagenowych napromieniowanych laserem KrF. Celem obecnie prezentowanej pracy jest określenie wpływu impulsów promieniowania UV generowanego przez laser ekscymerowy KrF ($\lambda = 248$ nm) na konformację oraz stabilność fotochemiczną łańcuchów polipeptydowych w błonach kolagenowych. Z zastosowaniem metod spektroskopowych podjęliśmy także próbę wyjaśnienia (na podstawie znanych mechanizmów ablacyjnych) zjawiska zniszczenia w wyniku działania takich impulsów unikatowej trójwymiarowej struktury białka (potrójnej helisy). Wszystkie przedsta-

wione analizy spektroskopowe dotyczyły wytworzonej laserowo struktury „mikropianki” na powierzchni błon kolagenowej.

STRUKTURALNA SPECYFIKA KOLAGENU

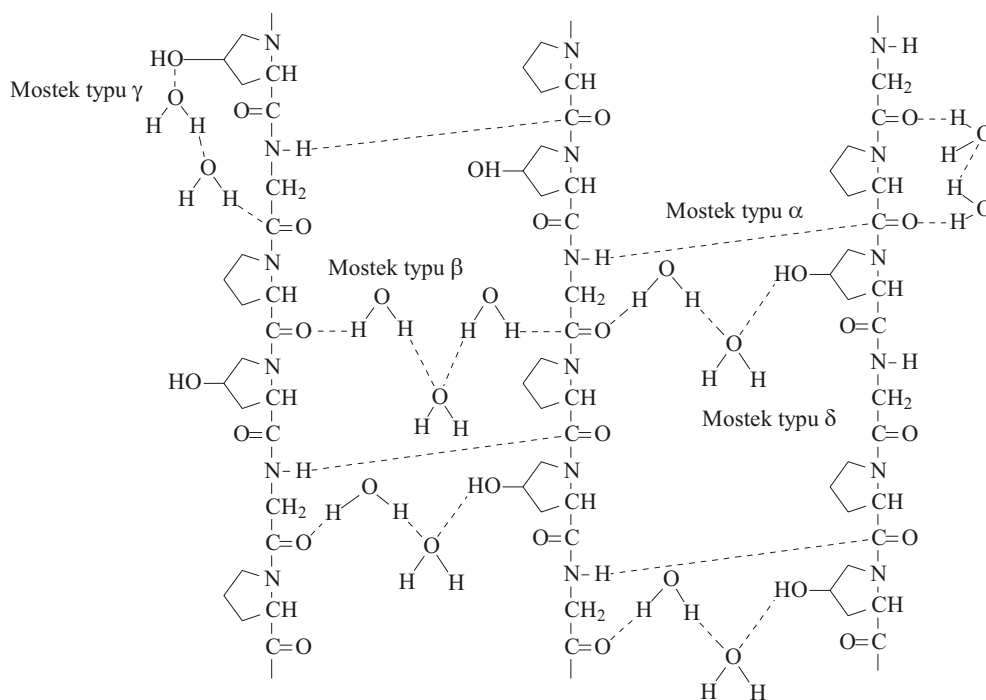
Jak już wspomnieliśmy [1], kolagen w ludzkim organizmie jest podstawowym składnikiem tkanki łącznej, stanowiąc ok. 25 % wszystkich białek. Znajduje się on w skórze, ścięgnach, kościach, rogówce oka, błonach i kapilarach [2—4]. Duża zawartość hydrofilowych reszt aminokwasowych, znacznie przekraczająca udział reszt lipofilowych [5], wyjaśnia zdolność materiałów kolagenowych do wiązania w swej strukturze ogromnych ilości wody [4, 6, 7]. Omawiany składnik tkanki łącznej, tak jak typowe białka, wykazuje kilka poziomów strukturalnej hierarchii określanymi mianem rzędowości (struktury: I-, II-, III-, IV- i V-rzędowe) [4, 5].

W kolagenach tworzących fibryle ponad 95 % cząstek jest związanych w postaci trzech łańcuchów poli-

¹⁾ Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń, e-mail: marcinw@chem.uni.torun.pl, as@chem.uni.torun.pl

²⁾ Université de Bordeaux 1, Laboratoire de Physicochimie Moléculaire UMR 5803 du CNRS 351 cours de la Libération, F-33405 Talence, France.

^{*)} Cz. I — por. [1].



Schemat A. Rodzaje mostków wodorowych występujących w tropokolagenie
Scheme A. Types of hydrogen bonds in tropocollagen

peptydowych (α -łańcuchów czyli helis) o specyficznej sekwencji aminokwasowej. Łańcuchy takie są zwinęte w prawoskrętną strukturę potrójnej helisy, podczas gdy każdy pojedynczy łańcuch ma strukturę lewoskrętną. Znanych jest obecnie aż 20 typów białka kolagenowego [8, 9]. Każdy z nich jest określany przez odpowiednią sekwencję aminokwasów tworzących pojedynczy α -łańcuch wewnątrz cząsteczki będącej podstawową jednostką struktury potrójnej helisy — tropokolagenu [5]. Większość typów kolagenu odkrytych w organizmie człowieka tworzy fibryle, podczas gdy inne typy występują w postaci włóknistych sieci, „koralikowych” bądź też służą jako połączenia albo pomiędzy włóknami kolagenu albo pomiędzy fibrylami i innymi składnikami zewnątrzkomórkowej matrycy [4, 5, 8].

W kolagenach tworzących fibryle ok. 25 % aminokwasów α -łańcucha stanowią prolina (Pro) lub hydroksyprolina (Hyp). Iminokwasy te efektywnie blokują (w miejscach występowania) rotację łańcucha kolagenu i tym samym stabilizują strukturę potrójnej helisy [5]. Taki sztywny szkielet cząsteczki tropokolagenu charakteryzuje się więc dużą wytrzymałością mechaniczną.

Każdy z trzech pojedynczych α -łańcuchów zawiera ok. 1000 reszt aminokwasów, wśród których niemal co trzecią pozycję zajmuje glicyna (Gly). Sekwencję pojedynczej helisy opisuje się zatem często jako $(\text{Gly-Pro-Y})_n$, gdzie Y oznacza dowolną resztę aminokwasową [10—14].

Przestrzenne rozmieszczenie reszt aminokwasowych wewnątrz poszczególnych α -łańcuchów wyklucza tworzenie ich kosztem wiązań kowalencyjnych pomiędzy helisami w cząsteczce tropokolagenu. Strukturę potrój-

nej helisy utrzymują mostki wodorowe powstające między grupą -NH glicyny a grupą karboksylową -C=O reszty innego łańcucha (mostek α , schemat A) lub między grupami -OH hydroksyprolin oraz poprzez mostki wodorowe z cząsteczkami wody (mostki typu β , γ i δ) [15—17]. Oprócz wymienionych wiązań wodorowych wpływ na dalszą stabilizację struktury potrójnej helisy mają także inne oddziaływania krótkiego zasięgu, takie jak van der Waalsa, hydrofobowe bądź elektrostatyczne [4, 18].

Spośród wszystkich aminokwasów dwa specyficzne typy występują prawie wyłącznie w kolagenie. Są to 4- i 3-hydroksyprolina [14] oraz 5-hydroksylizyna (Hys). Pierwszy z nich odgrywa istotną rolę stabilizującą strukturę helikalną w połączeniach międzylańcuchowych z udziałem mostków wodorowych, drugi natomiast jest kowalencyjnie związany z oligosacharydami, przede wszystkim disacharydami glukoza/galaktoza.

Ze względu na właściwości biologiczne, nietoksyczność oraz powszechność występowania, kolagen jest stosowany jako biomateriał w medycynie, przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym [19]. W procesach przetwarzania kolagenu uzyskuje się błony, pianki, membrany i włókna.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Otrzymywanie próbek

W badaniach posłużono się próbkami błon kolagenowych uzyskanymi i napromienianymi laserem w sposób opisany w [1].

Metody badań

Spektroskopia ramanowska

Widma błon kolagenowych przed i po napromienianiu światłem laserowym zarejestrowano za pomocą konfokalnego mikrospektrometru ramanowskiego (Horiba Group, $\lambda = 514,5$ nm, laser argonowy o energii 10 mW) w atmosferze powietrza, w temperaturze pokojowej. Analizy pasm dokonano posługując się programem „LabSpec” obsługującym spektrometr.

Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni

Widma FTIR-ATR błon nienapromienionych i napromienionych z zastosowaniem różnej liczby impulsów laserowych o różnej gęstości energii zarejestrowano spektrofotometrem „Nicolet Magna IR 560” w zakresie $4000\text{—}500$ cm^{-1} w temperaturze pokojowej (300 skanów). Badania dotyczyły próbek błon naświetlonych nie więcej niż 5 impulsami (większa ich liczba czyniła widma niemierzalnymi ze względu na zbyt dużą chropowatość analizowanej powierzchni). Wszystkie widma zarejestrowano w trybie ATR, wykorzystując kryształ diamentowy.

WYNIKI I DYSKUSJA

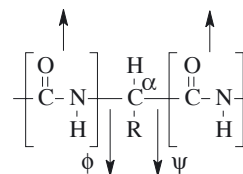
Analiza widma Ramana

Różne drgania oscylacyjne wiązań peptydowych -CO-NH obserwuje się w widmach Ramana jako pasma amidowe I, II, III, IV, V, VI, VII, A i B. Pasma II, V, VI, VII, A i B są przeważnie bardzo słabo widoczne, natomiast częstotliwość pasm I i III o stosunkowo dużej intensywności koreluje ze strukturą wewnętrzną białka bądź z jego konformacją. Podstawowe (ok. 80 %) źródło pasma amidowego I stanowią drgania rozciągające (w płaszczyźnie) grupy karbonylowej -C=O peptydu, pewien udział wnoszą również drgania skręcające (w płaszczyźnie) grupy N-H [20, 22].

Pasma amidowe III pochodzi w 40 % od drgań rozciągających grupy C-N, w 30 % od drgań skręcających (w płaszczyźnie) grupy N-H i w 20 % od drgań rozciągających grupy CH₃-C- [21, 22]. Aby można było wykorzystać pasma amidowe I i III jako kryterium pozwalające na określenie konformacji białka lub pojedynczego łańcucha polipeptydowego, odpowiadające tym pasmom oscylacyjne liczby falowe powinny zostać skorelowane z tzw. kątami Ramachandrana (kąty rotacji ψ lub kąty torsyjne ϕ). Wynikają one z możliwości rotacji szkieletu polipeptydowego wokół wiązań C_(α)-C oraz N-C_(α) (schemat B) [21—24].

Konformację cząsteczki białka (np. kolagenu) określają również oddziaływania szkieletu z łańcuchem bocznym biopolimeru, często bardzo rozgałęzionym. Oddziaływania takie obejmują m.in. wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy atomem tlenu grupy karbonylowej każdego wiązania peptydowego, a ato-

sztywne, płaskie grupy peptydowe



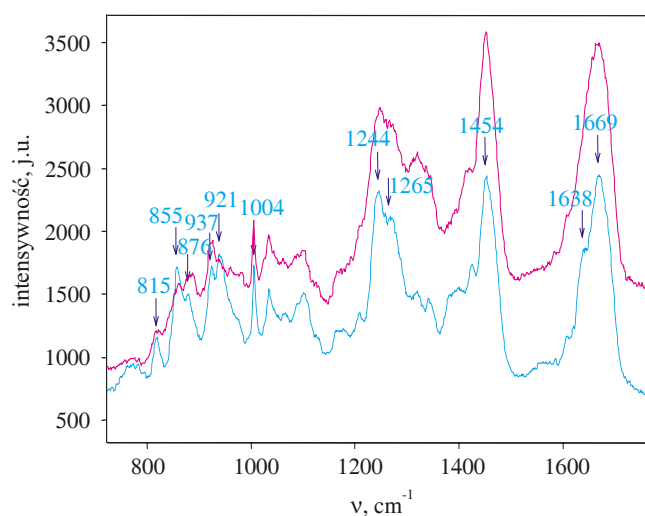
Schemat B. Możliwości rotacji szkieletu polipeptydowego wokół wiązań C_α-N (ϕ) i C_α-C (ψ)

Scheme B. Possibilities of polypeptide skeleton rotation round the bonds C_α-N (ϕ) and C_α-C (ψ)

mem wodoru grupy aminowej czwartego z kolei aminokwasu w sekwencji. Utworzone w ten sposób wiązanie wodorowe ma kierunek prawie równoległy do osi helisy [21, 24].

Zmiany konformacyjne w cząsteczce białka (np. przejście struktury helikalnej w strukturę kłębką statystycznego) charakteryzuje się na podstawie jednoczesnej interpretacji pasm amidowych I i III w widmie Ramana, albowiem analiza wyłącznie pojedynczego pasma amidowego III może — ze względu na jego bardzo złożony charakter — prowadzić do błędnych wniosków dotyczących zmian strukturalnych zachodzących w badanym materiale.

Rysunek 1 przedstawia widma Ramana błony kolagenowej — nienaświetlonej oraz poddanej działaniu pojedynczego impulsu laserowego o energii $1,0$ J/cm^2 — z zaznaczonymi wartościami liczb falowych odpowiadającymi głównym pasmom błony nienapromienianej. W zakresie $1669\text{—}1638$ cm^{-1} znajduje się pasmo amidowe I, przy czym wartość $\nu = 1669$ cm^{-1} odnosi się do fazy



Rys. 1. Widma Ramana powierzchni błony kolagenowej: nienaświetlonej (niebieska linia) oraz poddanej działaniu pojedynczego impulsu laserowego o energii $1,0$ J/cm^2 (czerwona linia)
Fig. 1. Raman spectra of collagen films surfaces: non-irradiated one (blue line) and exposed to single laser pulse of energy 1.0 J/cm^2 (red line)

nieuporządkowanej (kłębek statystyczny), wartość zaś $\nu = 1638 \text{ cm}^{-1}$ — do struktury α -helikalnej.

W przypadku pasma amidowego III (zakres 1265—1244 cm^{-1}), pierwsza wartość graniczna określa strukturę potrójnej helisy, druga — strukturę kłębka statystycznego.

Piki w przedziale 937—921 cm^{-1} są przypisywane drganiom rozciągającym grup C-N w prolinie lub drganiom łańcucha głównego potrójnej helisy, natomiast sygnały w zakresie 876—855 cm^{-1} pochodzą bądź również od proliny, bądź też od hydroksyproliny lub łańcucha bocznego hydrofobowego aminokwasu aromatycznego (tyrozyny). Pozostałe pasma pochodzą odpowiednio od: 1454 cm^{-1} — drgań deformacyjnych grup $-\text{CH}_3$ i $-\text{CH}_2$, 1004 cm^{-1} — drgań rozciągających w fenyloalaninie oraz 815 cm^{-1} — drgań rozciągających C-C w łańcuchu głównym cząsteczki kolagenu [21, 25—28].

W wyniku napromienienia nastąpił zanik pasma przy 1638 cm^{-1} , odpowiedzialnego za uporządkowaną strukturę α -helisy.

Jak już wspomnieliśmy, potrójna helisa w kolagenie jest utrzymywana poprzez rozległą sieć wiązań wodorowych, zwłaszcza pomiędzy grupą aminową glicyny w jednej helisie i grupą karboksylową proliny w pozycji X sąsiedniej helisy albo poprzez mostki „wodne” z udziałem prolin oraz hydroksyprolin w pozycji Y (w każdej nici potrójnej helisy kolagenu powtarza się sekwencja aminokwasowa Gly-X-Y, gdzie X — najczęściej prolina, Y zaś może stanowić hydroksyprolina) [15—17]. Zatem zanik wspomnianego pasma można przypisać rozrywaniu wiązań wodorowych i utracie przez cząsteczkę kolagenu swej pierwotnej naturalnej struktury.

Przejdźcie w nieuporządkowaną strukturę kłębka statystycznego ułatwia również wyeliminowanie oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych. Wskazują na to zmiany w obrębie pasma amidowego III przy 1265 cm^{-1} . Pik ulega nieznacznemu wygładzeniu, co świadczy o utracie pozostałych fragmentów uporządkowanej struktury. Istnienie wspomnianej budowy kłębka statystycznego potwierdza analiza pasma z zakresu 937—921 cm^{-1} , ponieważ to pasmo również zanika w wyniku konwersji helisy do nieuporządkowanej, przypadkowej struktury [21].

W widmie Ramana błony kolagenowej poddanej działaniu światła laserowego obserwuje się także zmiany w zakresie 876—855 cm^{-1} , co może być tłumaczone jako przekształcenie w mikrootoczeniu łańcucha bocznego tyrozyny znajdującej się w α -helisie [21] lub też w obrębie hydroksyproliny, stanowiącej jeden z trzech głównych składników aminokwasowej sekwencji kolagenu [15—17, 27]. Tyrozyna jest podstawowym chromoforem cząsteczki kolagenu, zdolnym do absorpcji światła nadfioletowego [29], w tym także impulsów generowanych przez laser ekscymerowy KrF. Jej cząsteczka bierze udział w tworzeniu wiązań wodorowych. Zmiany w mikrootoczeniu tyrozyny rozpatrujemy na podstawie dubletu pasm określonych liczbami falowymi 876 i

855 cm^{-1} , powstającego w wyniku rezonansu Fermiego pomiędzy drganiami pierścienia i nadtonem drgań skrecających (poza płaszczyznę) pierścienia w *para*-podstawionym benzenie. Występowanie dubletu tłumaczy się dwojako [21]. Po pierwsze rozważa się stosunek intensywności dwóch pików w odniesieniu do przypadku, gdy boczny łańcuch tyrozyny jest „odsłonięty” (występuje na zewnątrz łańcucha głównego, $I_{855} < I_{876}$) lub też „zasłonięty” (znajduje się wewnątrz łańcucha głównego, $I_{855} > I_{876}$). Drugi sposób interpretacji wiąże stosunek intensywności dubletu ze zdolnością grupy $-\text{OH}$ w tyrozynie do tworzenia wiązań wodorowych. Jeżeli bowiem tyrozyna jest „zasłonięta”, jej grupa hydroksylowa staje się donorem atomu wodoru w wiązaniu wodorowym, natomiast kiedy jest „odsłonięta” może być zarówno akceptorem, jak i donorem tego atomu we wspomnianym wiązaniu. W przypadku nienapromienionej błony kolagenowej pasmo przy $\nu = 855 \text{ cm}^{-1}$ ma większą intensywność, niż przy $\nu = 876 \text{ cm}^{-1}$, co mogłoby świadczyć o tym, że omawiany aminokwas aromatyczny jest „zasłonięty” bądź też, że jego grupa hydroksylowa jest donorem wiązania wodorowego [21].

W wyniku napromienienia stosunek intensywności pasm w dublecie ulega odwróceniu co sugeruje, że tyrozyna „odsłania” się stając się dzięki temu donorem, bądź akceptorem wodoru w wiązaniu wodorowym. Interpretacja analizowanego zakresu 867—855 cm^{-1} może uwzględnić również zaburzenia w sekwencji aminokwasów w kolagenie. Prawdopodobnie zaburzenia te dotyczą hydroksyproliny (855 cm^{-1}) — iminokwasu występującego, jak już wspomniano, prawie wyłącznie w kolagenie i odgrywającego istotną rolę w utrzymaniu struktury potrójnej helisy [14, 15, 17]. Ponieważ stabilność helisy kolagenowej zależy w dużym stopniu od wzajemnego stosunku zawartości proliny i hydroksyproliny, to jeśli obserwowane w widmie Ramana zaburzenia dotyczą hydroksyproliny, można się spodziewać, że nastąpiło przejście uporządkowanej struktury helisy w nieuporządkowaną strukturę kłębka statystycznego. Pasma przy 1004 cm^{-1} , przypisywane fenyloalaninie, praktycznie biorąc, nie zmienia się.

Porównując widma błony kolagenowej nienaświetlonej i napromienionej pojedynczym impulsem lasera UV zaobserwowaliśmy, że pasmo przy 815 cm^{-1} ulega dużej zmianie (zmiana kształtu i tzw. „rozmywanie”). Pasma to przypisywane jest drganiom rozciągającym wiązań C-C w łańcuchu głównym cząsteczki kolagenu. Tak duża zmiana sugeruje, że pod wpływem impulsu laserowego może następować rozerwanie takich wiązań. Sytuacja powyższa jest prawdopodobna ponieważ energia dysocjacji wiązań C-C wynosi tylko 3,6 eV, wobec tego energia fotonów generowanych przez laser ekscymerowy KrF (równa 5,0 eV) jest wystarczająca do spowodowania bezpośredniego rozrywania wiązań w łańcuchu głównym cząsteczki kolagenu [5, 30].

W publikacji [1] rozważaliśmy mechanizm powstawania struktury „mikropiankowej” na powierzchni błon

kolagenowych w ujęciu fotomechanicznym. Struktura taka jest wynikiem działania impulsów laserowych, przy czym, jak już wspomniano w [1], nie powstaje ona w klasycznym procesie ablacji prowadzącym do „czystego” trawienia warstw wierzchnich. Możemy jednak przypuszczać, że zmiany w wewnętrznej strukturze cząsteczki kolagenu zachodzą także na drodze ablacji przebiegającej wg mechanizmu fotochemicznego powodującego dekompozycję łańcucha głównego [31].

Jak wiadomo, z dysocjacją fotochemiczną mogą konkurować także inne procesy [5, 32, 33]. Obecnie uważa się, że energia nanosekundowych impulsów laserowych jest zużywana początkowo do wzbudzenia elektronowego, a następnie może powodować wewnętrzną konwersję zaabsorbowanej energii fotonu do stanów oscylacyjnych cząsteczki, co stanowi podstawę fototermicznego mechanizmu ablacji [5]. W praktyce, rozróżnienie tych dwóch mechanizmów ablacyjnych — fotochemicznego i fototermicznego — jest bardzo trudne ze względu na niewielki zasób danych doświadczalnych umożliwiających indywidualną interpretację obu tych modeli.

Analiza widm FTIR-ATR

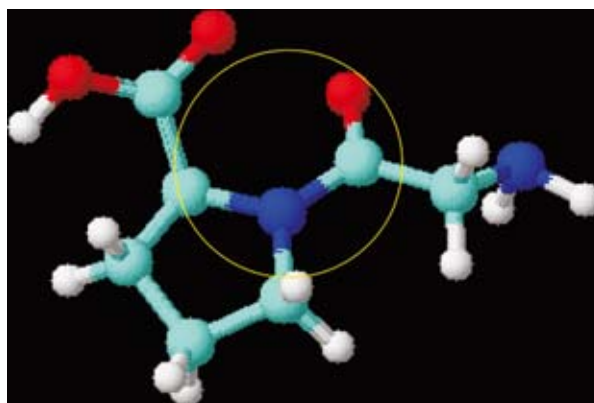
Rysunki 2—5 przedstawiają widma FTIR-ATR błon kolagenowych: nienaświetlonej oraz poddanej działaniu pojedynczych impulsów lasera o energiach z przedziału 0,4—1,7 J/cm². Główne pasma odpowiadają następującym liczbom falowym: 3300, 3078, 1629 i 1543 cm⁻¹. Liczba falowa $\nu = 3300$ cm⁻¹ jest przypisywana pasmu amidowemu A, będącemu odzwierciedleniem rezonansu Fermiego drgań rozciągających grupy N-H oraz pierwszego nadtonu pasma amidowego II [20, 22, 33], $\nu = 3078$ cm⁻¹ — pasmu amidowemu B, natomiast liczby falowe 1629 i 1543 cm⁻¹ odnoszą się do maksimów pasm amidowych I (80 % drgań rozciągających grupy karbonylowej C=O) i II (40 % drgań rozciągających grupy C-N oraz 60 % drgań skręcających grupy N-H) [20].

Wszystkie wymienione pasma są bardzo złożone, odpowiadają bowiem drganiom zarówno przypisywanym cząsteczkom wody, jak i wskazującym na udział poszczególnych struktur białkowych — potrójnej helisy i kłębka statystycznego [10, 22, 34, 35]. Tak więc, wszelkie zmiany spektralne w widmach zachodzące w wyniku działania promieniowania laserowego mogą być tłumaczone zniekształceniami konformacyjnymi w cząsteczce kolagenu.

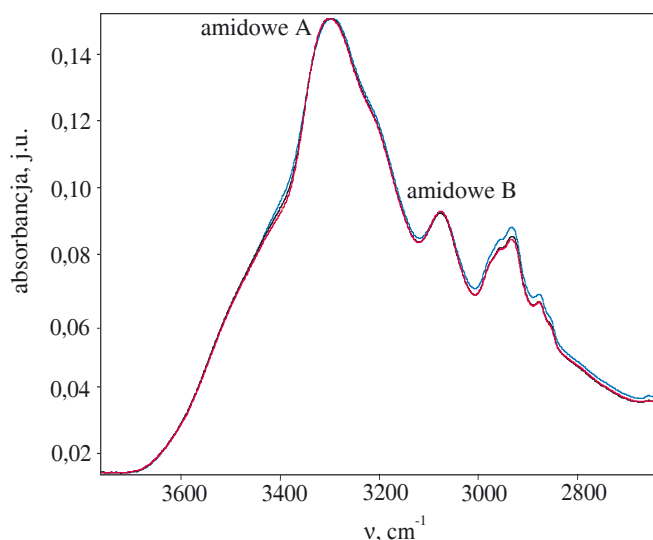
Warto także zauważyć, iż ze względu na specyficzną sekwencję aminokwasową (obecność proliny i hydroksyproliny) oraz zdolność grup N-H do tworzenia wiązań wodorowych, widmo kolagenu znacznie różni się od typowych widm innych związków białkowych. Dotyczy to zwłaszcza pasma amidowego A, które w kolagenie występuje zazwyczaj przy $\nu = 3325$ — 3330 cm⁻¹, a więc przy częstotliwości przesuniętej o co najmniej 25 cm⁻¹ w kierunku większych wartości ν w porównaniu z obserwowanymi w widmach innych białek.

Drgania własne (rozciągające) grupy N-H są źródłem pasma występującego zwykle w zakresie 3400—3440 cm⁻¹, jeżeli jednak wspomniana grupa peptydu tworzy sieć wiązań wodorowych, położenie pasma jest przesunięte w kierunku mniejszych wartości ν (3300 cm⁻¹, pasmo amidowe A) [20].

Odmienne niż w innych białkach [36] wiązanie peptydowe w kolagenie stanowi część struktury pięciocłonowego pierścienia proliny (schemat C):



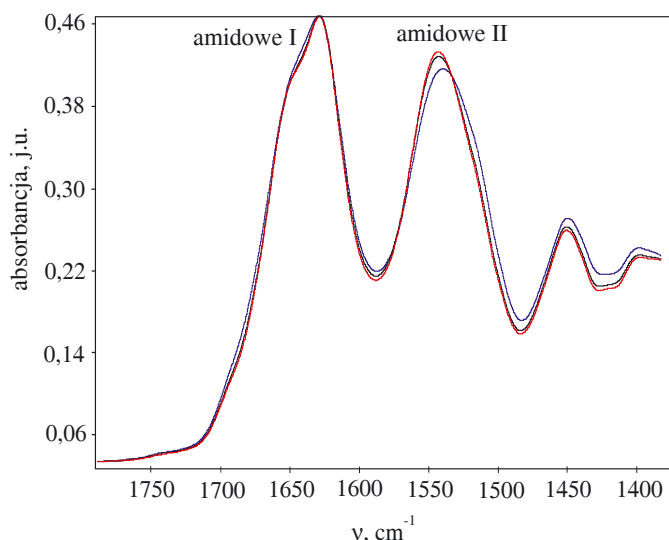
Schemat C. Fragment struktury kolagenu z zaznaczonym wiązaniem peptydowym włączonym w pierścień proliny
Scheme C. Part of collagen structure with marked peptide bond included into proline ring



Rys. 2. Widma FTIR-ATR (zakres $\nu = 3800$ — 2700 cm⁻¹) powierzchni błony kolagenowej: nienaświetlonej (czerwona linia) oraz poddanej działaniu pojedynczych impulsów laserowych o energii 0,4 J/cm² każdy (czarna linia — 3 impulsy, niebieska linia — 4 impulsy)

Fig. 2. FTIR-ATR spectra (range of $\nu = 3800$ — 2700 cm⁻¹) of collagen films surfaces: non-irradiated one (red line) and exposed to laser pulses of energy 0.4 J/cm² each (black line — 3 pulses, blue line — 4 pulses)

Konsekwencją tego faktu jest przesunięcie w kierunku większych liczb falowych pasma amidowego I (drga-



Rys. 3. Widma FTIR-ATR (zakres $\nu = 1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, energia impulsu $0,4\text{ J/cm}^2$) powierzchni błony kolagenowej; objaśnienia por. rys. 2

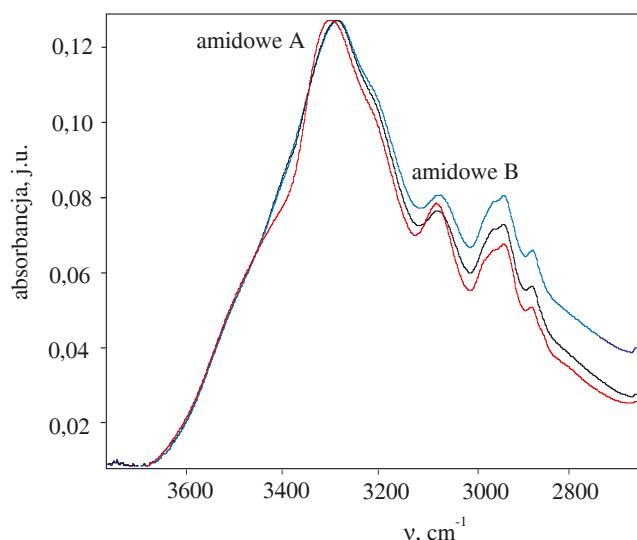
Fig. 3. FTIR-ATR spectra (range of $\nu = 1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, pulse energy 0.4 J/cm^2); explanations as in Fig. 2

nia rozciągające grupy C=O) pochodzącego od ugrupowań zawierających pierścienie pięciocłonowe typu laktamowego (prolina). Zgodnie z przewidywaniami, pasmo amidowe I w widmie kolagenu jest zazwyczaj znacznie szersze niż odpowiednie pasmo w widmach innych białek. Zjawisko to może być przypisane nakładaniu się pasma amidowego I z pasmem pierścienia proliny [33].

Rysunki 2 i 3 przedstawiają widma (zarejestrowane w różnych zakresach ν) błon kolagenowych — nienapromienionej i napromienionej pojedynczymi impulsami światła UV o energii bliskiej wartości progowej $0,4\text{ J/cm}^2$. Jak widać, zastosowanie 3 lub 4 impulsów laserowych spowodowało niewielkie przesunięcie pasma amidowego A i pasma amidowego II w kierunku mniejszych liczb falowych, nie zaobserwowano natomiast, praktycznie biorąc, żadnych zmian w obrębie pasma amidowego I.

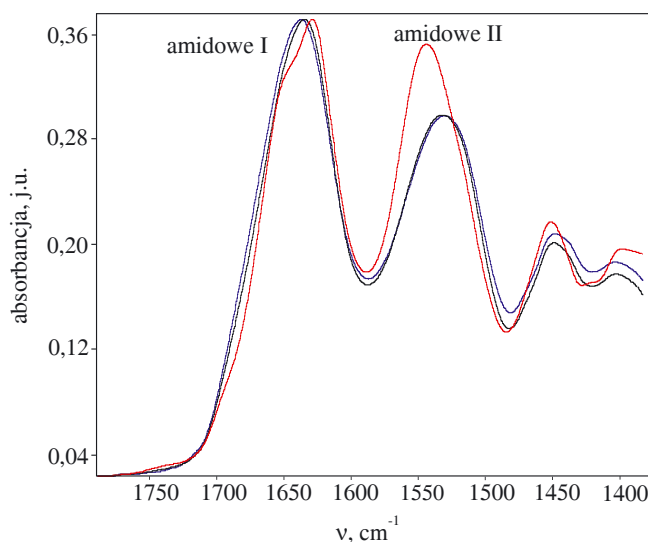
Większe zmiany pojawiły się wraz z użyciem 5 impulsów co sugeruje utratę wody przez cząsteczkę kolagenu i wywołane tym samym zaburzenia w wewnętrznej sieci wiązań wodorowych.

Dla porównania, na rys. 4 i 5 przedstawiono widma „mikropianki” kolagenowej uzyskanej w wyniku zastosowania pojedynczych impulsów laserowych o energii $1,7\text{ J/cm}^2$, tj. znacznie przekraczającej wartość progu ablacyjnego. W tym przypadku, użycie już tylko 1 impulsu spowodowało widoczne przesunięcia wszystkich pasm, połączone ze zmianą ich kształtu. Mianowicie, pasma amidowe A, B i II przesunęły się w kierunku mniejszych liczb falowych, natomiast pasma amidowe I — w kierunku wartości większych. Powyższe zmiany wskazują na rozrywanie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych utworzonych bądź bezpośrednio pomiędzy α -łań-



Rys. 4. Widma FTIR-ATR (zakres $\nu = 3800\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$) powierzchni „mikropianki” kolagenowej poddanej działaniu pojedynczych impulsów laserowych o energii $1,7\text{ J/cm}^2$ każdy (czarna linia — 1 impuls, niebieska linia — 2 impulsy); czerwona linia dotyczy porównawczej nienaświetlanej błony kolagenowej

Fig. 4. FTIR-ATR spectra (range of $\nu = 3800\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$) of collagen „micro-foam” surfaces exposed to laser pulses of energy 1.7 J/cm^2 each (black line — 1 pulse, blue line — 2 pulses). Red line describes non-irradiated collagen film



Rys. 5. Widma FTIR-ATR (zakres $\nu = 1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, energia impulsu $1,7\text{ J/cm}^2$) powierzchni „mikropianki” i błony kolagenowej; objaśnienia por. rys. 4

Fig. 5. FTIR-ATR spectra (range of $\nu = 1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, pulse energy 1.7 J/cm^2) of collagen „micro-foam” and non-irradiated collagen film; explanations as in Fig. 4

cuchami, bądź za pośrednictwem cząsteczek wody (mostki β i δ zaznaczone na schemacie A) [17].

Jak już wspomniano, wiązania wodorowe w strukturze potrójnej helisy powstają między grupą aminową glicyny jednej helisy i grupą karboksylową proliny

w pozycji X, zgodnie ze schematem znanym jako model II Richa i Cricka [37]. Dalsza stabilizacja opisywanej struktury może odbywać się dzięki obecności wody, która najprawdopodobniej jest wiązana poprzez tzw. mostki „wodne” typu α , β , γ i δ . Mostki α i γ tworzą się w obrębie pojedynczych łańcuchów pomiędzy grupami karbonylowymi proliny i glicyny (α) oraz między grupą hydroksylową hydroksyproliny i grupą karbonylową glicyny (γ). Mostki typu β (udział w nich biorą trzy lub cztery cząsteczki wody) i δ (z udziałem dwóch lub trzech cząsteczek wody) mogą natomiast łączyć grupy karbonylowe glicyny i proliny w sąsiednich łańcuchach (β) oraz grupy hydroksylowe hydroksyprolin z grupami karbonylowymi glicyn, również w sąsiednich α -helisach (δ) (por. schemat A) [15—17].

T a b e l a 1. Wpływ energii i liczby impulsów laserowego promieniowania UV na położenie (wartość ν) charakterystycznych pasm amidowych w widmie FTIR-ATR błon kolagenowych

T a b l e 1. Effects of energy and number of pulses of laser UV radiation on the positions (ν values) of characteristic amide bands in FTIR-ATR spectra of collagen films

Energia impulsu J/cm ²	Pasma amidowe	ν , cm ⁻¹		
		0 impulsów	1 impuls	2 impulsy
1,7	A	3300	3286	3284
	B	3078	3076	3074
	I	1629	1635	1637
	II	1543	1532	1530
1,4	A	3300	3285	3285
	B	3078	3074	3073
	I	1629	1635	1637
	II	1543	1529	1530
1,1	A	3300	3285	3285
	B	3078	3077	3076
	I	1629	1636	1637
	II	1543	1529	1531
0,7	A	3300	3293	3291
	B	3078	3077	3074
	I	1629	1630	1632
	II	1543	1540	1534
		0 impulsów	3 impulsy	4 impulsy
0,4	A	3300	3298	3295
	B	3078	3077	3076
	I	1629	1629	1630
	II	1543	1543	1540

Cząsteczki wody odgrywają więc istotną rolę w strukturze potrójnej helisy, ponieważ pozwalają na zachowanie konformacji cząsteczek kolagenu oraz wpływają na właściwości fizyczne fibryl kolagenowych [38].

Ubytek wody z błon kolagenowych napromienianych impulsowym światłem lasera KrF i związane z tym zmniejszenie liczby wiązań wodorowych stabilizujących strukturę potrójnej helisy może być przyczyną ob-

serwowanych zmian położenia pasm amidowych w uzyskanych widmach. Zatem pojedynczy impuls o energii 1,7 J/cm² jest całkowicie wystarczający do tego, aby spowodować przejście uporządkowanej struktury w strukturę kłębką statystycznego, co odzwierciedla maksymalne przesunięcie pasm. Kolejne impulsy nie wpływają już w istotny sposób na kształt oraz położenie pasm amidowych, należy więc przypuszczać, że całość procesów zachodzi podczas trwania pojedynczej akcji laserowej. Wyniki uzyskane metodą FTIR-ATR potwierdzają dane otrzymane za pomocą spektroskopii Ramana.

Alternatywna interpretacja zmian zachodzących w obrębie pasma amidowego I (zmiana kształtu i jego „wyostrenie”, rys. 5) dopuszcza fotochemiczną dekompozycję pięcioczłonowego pierścienia w prolinie [33]. Energia fotonów generowanych przez laser ekscymerowy KrF (5,0 eV) jest dostatecznie duża, aby spowodować częściowe zniszczenie tego pierścienia zaangażowanego m.in. w tworzenie wiązania peptydowego (por. schemat C). Ponieważ prolina jest iminokwasem w wysokim stopniu wpływającym na stabilność uporządkowanej struktury, jej dekompozycja doprowadziłaby do zaburzenia wszelkich oddziaływań z udziałem mostków wodorowych oraz „wodnych”.

Przesunięcia analizowanych pasm pod wpływem różnych energii padających impulsów zestawiono w tabeli 1.

PODSUMOWANIE

Napromienianie błon kolagenowych laserem ekscymerowym KrF spowodowało „spienienie” powierzchni prowadzące do utworzenia struktury „mikropianki”. Z analizy widm Ramana oraz FTIR-ATR wynika, że impulsowe światło lasera UV jest zdolne do wywołania zmian konformacyjnych w napromienianych błonach, przede wszystkim na drodze rozrywania sieci wiązań wodorowych i utraty cząsteczek wody, uczestniczących w utrzymywaniu uporządkowanej struktury. Możliwa jest przy tym również częściowa dekompozycja łańcucha głównego.

Uzyskane wyniki sugerują, że omawiane w niniejszej pracy efekty oddziaływań światła laserowego z kolagenem można rozpatrywać nie tylko w ujęciu fotomechanicznym (por. [1]), ale również z punktu widzenia udziału mechanizmu fotochemicznego i fototermicznego.

LITERATURA

- Wiśniewski M., Sionkowska A., Kaczmarek H., Lazare S., Tokarev V.: *Polimery* 2007, 52, 259.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: „Molecular biology of the cell”, Garland Press, New York 1994.
- Parry D. A. D., Craig A. S.: w pracy zbiorowej „Ultrastructure of the connective tissue matrix” (red. Rug-

- geri A., Motta P. M.), Martinus Nijhof, Boston 1984, str. 70—100.
4. Sionkowska A., Kamińska A., Miles Ch. A., Bailey A. J.: *Polimery* 2001, **46**, 379.
 5. Vogel A., Venugopalan V.: *Chem. Rev.* 2003, **103**, 577.
 6. Piez K. A.: w pracy zbiorowej „Molecular and aggregate structures of the collagen, in extracellular matrix biochemistry” (red. Piez K. A., Reddi A. H.), Elsevier Science, New York 1994, str. 58—89.
 7. Silver F. H.: „Connective tissue structure in biological materials: structure, mechanical properties and modelling of soft tissue”, University Press, New York 1987.
 8. Bailey A. J., Paul R. G.: *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 1998, **82**, 104.
 9. Van der Rest R., Garrone M.: *FASEB J.* 1991, **5**, 2814.
 10. Ellis D. O., McGavin S.: *J. Ultrastruct. Res.* 1970, **32**, 191.
 11. Prockop J., Fertala A.: *J. Struct. Biol.* 1998, **122**, 111.
 12. Bella J., Eaton M., Brodsky B., Berman H. M.: *Science* 1994, **266**, 75.
 13. Persikov A. V., Ramshaw J. A. M., Kirkpatrick A., Brodsky B.: *Biochem.* 2000, **39**, 14 960.
 14. Jenkins C. L., Bretscher L. E., Guzei I. A., Raines R. T.: *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125**, 6422.
 15. Bella J., Brodsky B., Berman H. M.: *Structure* 1995, **3**, 893.
 16. Bella J., Berman H. M.: *J. Mol. Biol.* 1996, **264**, 734.
 17. Kramer R. Z., Berman H. M.: *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1998, **16**, 367.
 18. Nimni M. E., Harkness R. D.: w pracy zbiorowej „Collagen: Biochemistry, Biomechanics, Biotechnology” (red. Nimni M. E.), t. 1., CRC Press, Boca Raton 1988, str. 5—45.
 19. Lee Ch. H., Singla A., Lee Y.: *Int. J. Pharma.* 2001, **221**, 1.
 20. Doyle B. B., Bendit E. G., Blout E. R.: *Biopolymers* 1975, **14**, 937.
 21. Clark R. J. H., Hester R. E.: „Spectroscopy of biological systems”, John Wiley & Sons Ltd., 1986.
 22. Barth A., Zscherp Ch.: *Quart. Rev. Biophys.* 2002, **35**, 369.
 23. Zerbi G.: „Modern polymer spectroscopy”, Wiley-VCH, New York 1999.
 24. Hames B. D., Hooper N. M.: „Biochemia — krótkie wykłady”, PWN, Warszawa 2002.
 25. Edwards H. G. M., Farwell D. W., Holder J. M., Lawson E. E.: *J. Mol. Struct.* 1997, **435**, 49.
 26. Wang Y. N., Galiotis C., Bader D. L.: *J. Biomech.* 2000, **33**, 483.
 27. Fendel S., Schrader B.: *Frasenius J. Anal. Chem.* 1998, **360**, 609.
 28. Dong R., Yan X., Pang X., Liu Sh.: *Spectrochim. Acta A* 2004, **60**, 557.
 29. Davies M. J.: *BBRC* 2003, **305**, 761.
 30. Srinivasan R., Braren D.: *Chem. Rev.* 1989, **89**, 1303.
 31. Srinivasan R., Leigh W. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 1982, **104**, 6784.
 32. Dyer P. E.: *Appl. Phys. A* 2003, **77**, 167.
 33. Tsuboi Y., Kimoto N., Kabeshita M., Itaya A.: *J. Photochem. Photobiol. A* 2003, **145**, 209.
 34. Kaminska A., Sionkowska A.: *Polym. Degrad. Stab.* 1996, **51**, 19.
 35. Tsunoda K., Sugiura M., Sonoyama M., Yajima H., Ishii T., Taniyama J., Itoh H.: *J. Photochem. Photobiol. A* 2001, **145**, 195.
 36. Dziuba J., Niklewicz M., Iwaniak A., Darewicz M., Minkiewicz P.: *Polimery* 2005, **50**, 424.
 37. Sionkowska A.: *Polym. Degrad. Stab.* 2000, **68**, 147.
 38. Rich A., Crick F. H. C.: *J. Mol. Biol.* 1961, **3**, 483.

Otrzymano 11 IV 2006 r.