

P O L I M E R Y

MIESIĘCZNIK POŚWIĘCONY CHEMII, TECHNOLOGII I PRZETWÓRSTWU POLIMERÓW

ALINA SIONKOWSKA^{*)}, ALINA KAMIŃSKA^{*)},
CHRISTOPHER A. MILES^{**)}, ALLEN J. BAILEY^{**)}

Wpływ promieniowania UV na strukturę i właściwości kolagenu

THE EFFECT OF UV RADIATION ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF COLLAGEN

Summary — A review with 130 references covering photochemical damage caused by UV rays in collagen. The damage is known to be related to collagen type and age, and to the nature of the admixtures present in collagen, but the mechanism of the damage has not yet been fully recognized. Collagen's chemical structure is discussed in detail to present collagen properties of various collagen types before and after collagen has been UV-irradiated.

Key words: collagen, chemical structure, UV irradiation, photodegradation.

Promieniowanie UV, którego źródłem jest słońce, towarzyszy człowiekowi od początków jego istnienia na naszej planecie. Już w starożytności zastanawiano się, czy promieniowanie słoneczne wywiera tylko korzystny wpływ na organizmy żywe [1]. Pierwsze dane dotyczące tego problemu pochodzą z roku 1887, kiedy to zauważono, że promieniowanie UV zabija bakterie. Od tej chwili znacznie wzrosło zainteresowanie promieniowaniem UV jako czynnikiem szkodliwym dla żywych organizmów. Z czasem powstały odrębne dziedziny nauki zajmujące się oddziaływaniem promieniowania UV z materią ożywioną i nieożywioną: fotobiologia i fotochemia.

Promieniowanie UV emitowane przez słońce to UVC (220—290 nm), UVB (290—320 nm) oraz UVA (320—400 nm). Przed działaniem promieniowania UVC chroni nas warstwa ozonu zawarta w stratosferze Ziemi, natomiast promieniowanie UVA i UVB penetruje powierzchnię ziemi i oddziałuje z organizmami żywymi. W ostat-

nich latach na skutek pojawienia się dziury ozonowej znacznie wzrosła dawka promieniowania UV docierającego do nas [2—4] oraz zwiększyło się jeszcze zainteresowanie wpływem tego promieniowania na organizmy żywe. Odpowiednie dawki promieniowania UV mogą mieć działanie lecznicze w niektórych schorzeniach, jak np. łuszczyca, a nawet pomagać w wykrywaniu i leczeniu niektórych nowotworów [5, 6]. Promieniowanie to może też być szkodliwe, np. niszcząc strukturę białka zawartego w oku lub skórze [7—11]. Głównym składnikiem skóry jest kolagen — białko o specyficznej budowie, właściwościach i funkcjach przez nie pełnionych. Aby przynajmniej częściowo wyjaśnić przebieg procesów wywołanych promieniowaniem UV w tym właśnie białku konieczne jest na tle omówienia jego budowy wskazanie najbardziej wrażliwych na działanie energii świetlnej fragmentów kolagenu.

WYSTĘPOWANIE KOLAGENU I JEGO ROLA W ORGANIZMIE ŻYWYM

Kolagen jest białkiem włóknistym spotykanym we wszystkich organizmach wielokomórkowych [12, 13]. Stanowi on główny składnik skóry, kości, ścięgien,

*) Uniwersytet M. Kopernika, Wydział Chemii, ul. Gagarina 11, 87-100 Toruń.

***) University of Bristol, Collagen Research Group, Langford, Wielka Brytania.

^{a)} e-mail: as@chem.uni.torun.pl; autorka do której należy kierować ewentualną korespondencję.

chrząstek oraz zębów i występuje niemal we wszystkich narządach, służąc jako substancja spajająca komórki. Wszelkiego rodzaju tkanka łączna i narządy, w skład których ona wchodzi, zawierają kolagen [14]. Przeciętną zawartość kolagenu w różnych narządach podaje tabela 1. Zawartość kolagenu w ustroju zwierzęcym zależy nie tylko od rodzaju tkanki, ale również od wieku, gatunku oraz płci danego zwierzęcia [16].

Powstawanie i przemiany kolagenu są funkcją działania tkanki łącznej. Oznacza to, że wytwarzanie tego białka zachodzi zarówno w komórce, jak i poza nią, czyli w substancji podstawowej tkanki łącznej [17]. Jak wynika z tabeli 1, największe skupiska kolagenu

T a b e l a 1. Przeciętna zawartość kolagenu w różnych narządach [15]

T a b l e 1. Average collagen percentages in various body tissues [15]

Narząd	Procentowa zawartość kolagenu w stosunku do masy świeżego narządu
Ścięgna	25—30
Skóra	20—30
Kości, chrząstka	10—20
Ścianki naczyń krwionośnych	5—12
Ścianki jam ciała	2—8
Tkanka mięśniowa, mięsień sercowy	1—2
Narządy mięsiste (wątroba, nerki)	0,5—2
Centralny układ nerwowy	0,2—0,4
Ciecz wodnista oka	0,01—0,05

tworzą się tam, gdzie tkanka łączna jest tkanką podstawową dla danego narządu (tak jest w przypadku skóry, kości, ścięgien). Kolagen pełni główne funkcje podporowe w organizmie, stanowiąc czynnik kontrolujący rozmieszczenie sił wewnętrznych i zewnętrznych działających na ustrój [18].

Dzięki swojej strukturze nadcząsteczkowej umożliwiającej wiązanie dużej ilości wody, białko to charakteryzuje się znaczną elastycznością. Sprawia to, że skóra i narządy wewnętrzne są rozciągliwe i mają dużą wytrzymałość na mechaniczne rozerwanie [19]. W miarę jednak starzenia się organizmów maleje w kolagenie zawartość wody związanej, a jej miejsce zajmują wiązania sieciujące usztywniające skórę, ścięgna bądź narządy wewnętrzne [20]; stają się więc one mniej elastyczne i bardziej wrażliwe na działanie czynników mechanicznych. W organizmach starszych trudniej goją się rany i trudniej zrastają kości. Poza wzmacnianiem struktury tkanki, kolagen bierze także udział w reakcjach immunologicznych, w nadawaniu kształtu komórkom i przeciwdziałaniu powstawaniu nowotworów [21].

BUDOWA KOLAGENU

Niezależnie od swego pochodzenia kolagen zawiera co najmniej 19 różnych aminokwasów. Zestawienie

wszystkich aminokwasów w kolagenie podaje tabela 2; kolejność ich ułożenia w łańcuchach polipeptydowych zależy od rodzaju kolagenu i stanowi jego strukturę pierwszorzędową [24]. Jak wynika z tabeli 3, skład ilo-

T a b e l a 2. Aminokwasy wchodzące w skład kolagenu (Ar — pierścień aromatyczny) [22, 23]

T a b l e 2. Amino acids in collagen (Ar — aromatic ring) [22, 23]

Nazwa potoczna aminokwasu	Stosowany skrót nazwy aminokwasu	Wzór strukturalny
1	2	3
Glicyna	Gly	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Alanina	Ala	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Walina	Val	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}(\text{CH}_3)-\text{CH}-\text{COOH}$
Leucyna	Leu	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$
Izoleucyna	Ile	$\text{CH}_3\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}(\text{CH}_3)-\text{CH}-\text{COOH}$
Fenylalanina	Phe	$\text{Ar}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Prolina	Pro	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{N}-\text{H} \end{array}$
Seryna	Ser	$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Treonina	Tre	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Metionina	Met	$\text{CH}_3-\text{S}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}-\text{COOH}$
Tyrozyna	Tyr	$\text{HO}-\text{Ar}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
4-Hydroksyprolina	4-Hypro	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{N}-\text{H} \end{array}$
3-Hydroksyprolina	3-Hypro	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{N}-\text{H} \end{array}$
Asparagina	Asp-(NH ₂)	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Glutamina	Glu-(NH ₂)	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Kwas asparaginowy	Asp	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$

1	2	3
Kwas glutaminowy	Glu	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Lizyna	Liz	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Hydroksylizyna	Hylys	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Arginina	Arg	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Histydyna	His	$\text{HC}=\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{CH}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$

T a b e l a 3. Skład ilościowy aminokwasów w kolagenie różnego pochodzenia (skład wyrażony liczbą reszt aminokwasu na 1000 reszt aminokwasowych) [16]

T a b l e 3. The composition amino acids in some mammalian collagen types (expressed as amino acid residues/1000 amino acid residues) [16]

Pochodzenie kolagenu	Aminokwas						
	Skóra ludzka	Skóra królicza	Ścięgno bydłce	Ścięgno ogona szczura	Skóra cielęca	Skóra dorsza	Ząb rekina
Alanina	114,5	101,8	97,8	99,3	112,0	111,0	107,0
Glicyna	324,4	307,4	336,5	351,0	230,0	347,0	321,0
Walina	24,5	21,5	21,5	22,5	20,0	19,8	26,0
Leucyna	28,8	23,2	27,3	22,2	25,0	20,6	26,0
Izoleucyna	10,4	15,0	14,5	13,2	11,0	11,0	20,0
Prolina	125,1	141,9	144,2	123,0	138,0	98,0	102,0
Fenylalanina	12,6	12,3	15,3	14,3	13,0	11,5	14,0
Tyrozyna	3,5	2,0	4,8	5,4	2,6	3,6	6,2
Seryna	36,9	40,1	29,5	27,8	36,0	66,0	51,0
Treonina	18,3	19,7	18,9	19,1	18,0	23,2	25,0
Cystyna	—	0,2	—	—	1,0	—	—
Metionina	7,0	8,6	3,6	5,8	4,3	16,7	14,0
Arginina	49,0	45,3	45,4	46,5	50,0	52,0	51,0
Histydyna	5,4	5,5	6,5	3,3	5,0	7,7	7,3
Lizyna	26,7	27,3	22,4	35,6	27,0	26,2	19,0
Kwas asparaginowy	47,2	50,2	48,0	47,1	45,0	51,0	57,0
Kwas glutaminowy	77,7	68,7	71,4	73,7	72,0	75,0	72,0
Hydroksyprolina	90,9	103,6	83,4	90,4	94,0	54,0	62,0
Hydroksylizyna	5,9	4,9	9,3	—	7,4	6,6	12,0

ściowy aminokwasów zmienia się w zależności od pochodzenia kolagenu. Aminokwasem dominującym jest glicyna, po niej następuje prolina, alanina, hydroksyprolina, kwas glutaminowy, arginina, kwas asparaginowy. Różnice między zawartością większości aminokwasów w kolagenie różnego pochodzenia są niewielkie. Na uwagę zasługują jednak wyraźne różnice w zawartości alaniny, glicyny, leucyny, proliny, seryny, a zwłaszcza 30-proc. różnica w zawartości hydroksyproliny,

której przypisuje się utrzymywanie w kolagenie jego specyficznej konformacji. Wykazano, że najczęściej powtarzającą się jednostką w długim łańcuchu białkowym kolagenu jest układ $(\text{Gly-X-Y})_n$, gdzie X i Y są dowolnymi aminokwasami wymienionymi w tabeli 2 (z wyjątkiem glicyny i tryptofanu) zaś $n = 338$ [25—30].

Skład sekwencji aminokwasowej określa, jak już podaliśmy, strukturę pierwszorzędową kolagenu. Łańcuch polipeptydowy zawiera szereg wiązań, wokół których może się odbywać wewnętrzna rotacja. Konformacja łańcuchów polipeptydowych w postaci helisy stanowi drugorzędową strukturę kolagenu [31, 32]. Struktura trzeciorzędowa powstaje w wyniku połączenia trzech łańcuchów polipeptydowych w potrójną helisę [33—35], struktura czwartorzędowa tworzy się na drodze połączenia potrójnych helis w fibryle [36—39], a struktura piątego rzędu to skutek połączenia fibryl we włókna [40]. Powstawanie powyższych struktur (z wyjątkiem pierwszorzędowej) jest możliwe dzięki wiązaniom sieciującym, wśród których dominującą rolę

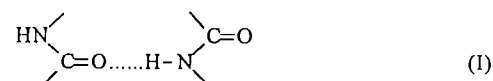
T a b e l a 4. Rodzaje wiązań sieciujących w kolagenie [por. wzory (I)—(IX)]

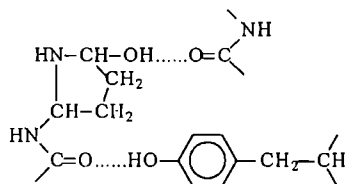
T a b l e 4. Types of cross-links in collagen [cf. formulas (I)—(IX)]

Rodzaj wiązania	Charakterystyka wiązania
Wiązania wodorowe	Wiązania wewnątrz- i międzycząsteczkowe wywierające wpływ na konformację łańcucha peptydowego oraz na trwałość struktury cząsteczkowej i nadcząsteczkowej kolagenu; mogą występować między grupami peptydowymi (I) lub między grupami polarnymi łańcuchów bocznych i grupami peptydowymi (II)
Wiązania hydrofobowe	Wiązania wewnątrz- i międzycząsteczkowe wpływające na konformację łańcucha peptydowego i powodujące wzrost spójności międzycząsteczkowej w środowisku wodnym
Wiązania jonowe	Wylącznie wiązania międzycząsteczkowe biorące udział w tworzeniu fibryl kolagenowych (struktury czwartorzędowej); są powodem pęcznienia kolagenu w kwasach i zasadach
Wiązania kowalencyjne (izopeptydowe, glikozydowe, aldolowe α , β -nienasycone, histydyloaldolowe, azometinowe, heksozaminowe, hydroksymerodesmozynowe)	Mogą być między- i wewnątrzcząsteczkowe; występują głównie w starej tkance łącznej i w tkance zawierającej polisacharydy

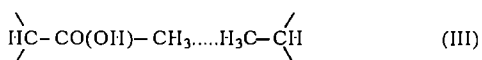
odgrywa wiązanie wodorowe. Wiązania sieciujące mające znaczenie w kształtowaniu struktury kolagenu zestawiono w tabeli 4. A oto ich budowa chemiczna:

Wiązania wodorowe:

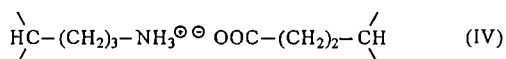




(II)

Wiązania **hydrofobowe**:

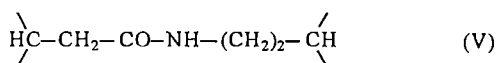
(III)

Wiązania **jonowe**:

(IV)

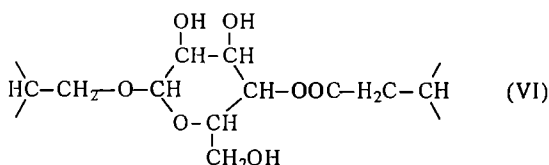
Wiązania **kowalencyjne**:

a) izopeptydowe:

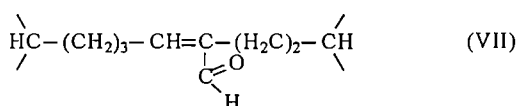


(V)

b) glikozydowe:

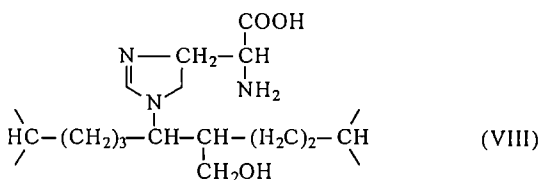


(VI)

c) aldolowe α , β -nienasycone:

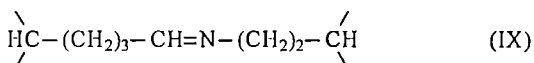
(VII)

d) histydyloaldolowe:



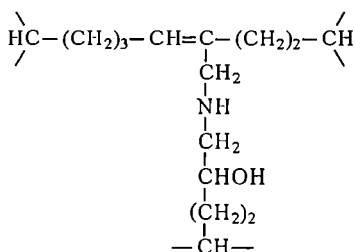
(VIII)

e) azometinowe:



(IX)

f) hydroksy mezodesmozynowe:



(X)

Czynniki zewnętrzne, takie jak podwyższona temperatura lub zmiana wartości pH, mogą doprowadzić do zniszczenia naturalnej struktury białka, np. do jego denaturacji [41—54].

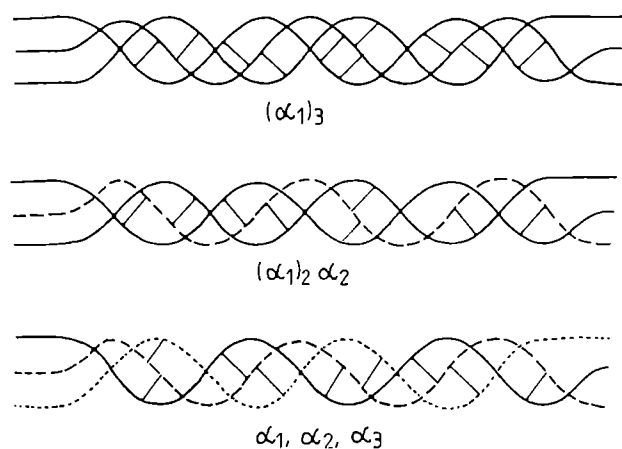
Szczegółowe badania pozwoliły na podzielenie kolagenu na 19 różnych typów [22, 23, 55, 56], które stanowią rodzinę kolagenów. Charakterystykę wybranych typów kolagenu przedstawia tabela 5. Tak więc cząstecz-

Tabela 5. Pochodzenie wybranych typów kolagenu i ich skład [55, 56]

Table 5. The origin and structure of various collagen types [55, 56]

Typ kolagenu	Skład podjednostkowy	Główne miejsca występowania
Typ I	$[\alpha_1(\text{I})]_2\alpha_2(\text{I}); [\alpha_1(\text{I})]_3$	skóra, kości, ścięgna, ściany tętnic, macica
Typ II	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	chrząstka
Typ III	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	skóra, ściany tętnic, macica
Typ IV	$[\alpha_1(\text{IV})]_3; [\alpha_2(\text{IV})]_3$	blony podstawne
Typ V	$\alpha_1(\text{V})\alpha_2(\text{V})\alpha_3(\text{V})$	łożysko, rogówka, skóra, kości
Typ VI	$\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_3(\text{VI})$	ściany tętnic, macica, łożysko, rogówka
Typ VII	$[\alpha_1(\text{VII})]_3$	blony płodowe, skóra
Typ VIII	$[\alpha_1(\text{VIII})]_3$	śródbłonki naczyniowe, niektóre nowotwory
Typ IX	$\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX})$	chrząstka
Typ X	$[\alpha_1(\text{X})]_3$	chrząstka
Typ XI	$\alpha_1(\text{XI})\alpha_2(\text{XI})\alpha_3(\text{XI})$	chrząstka
Typ XII	nieznany	ścięgna embrionalne

ka kolagenu może składać się z trzech łańcuchów identycznych (np. typ II), z trzech łańcuchów o różnym składzie aminokwasowym (np. typ V) lub z dwóch jednakowych łańcuchów i trzeciego innego (jeden z wariantów typu I); ilustruje to rysunek 1.



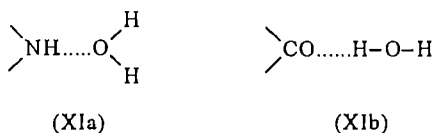
Rys. 1. Potrójnie helikalna struktura kolagenu — możliwość występowania jednakowych bądź różnych łańcuchów α (linie poprzeczne oznaczają międzyłańcuchowe wiązania wodorowe)

Fig. 1. The triple helical structure of collagen with possible identical or different α -chains (straight lines indicate inter-chain hydrogen bonds)

Jak już stwierdziliśmy uprzednio, w miarę starzenia się organizmu wzrasta liczba wiązań sieciujących (głównie kowalencyjnych), co powoduje, że struktura kolagenu staje się bardziej sztywna, a kolagen z postaci rozpuszczalnej przechodzi w nierozpuszczalną [20].

WODA W STRUKTURZE KOLAGENU

Woda jest nieodłącznym składnikiem białek i wpływa w sposób istotny na ich strukturę oraz funkcje pełnione w organizmach [57]. Charakter struktury wewnętrznej wody oraz duża reaktywność jonów H^+ i OH^- są powodem specyficznego jej oddziaływania z kolagenem, bowiem w przypadku jego struktury drugo- i trzeciorzędowej istotna jest konkurencja między wiązaniami wodorowymi grup $>NH\cdots OC<$ białka oraz wiązaniami wodorowymi tych grup z wodą:



Wykazano, że energia powstawania peptydowych wiązań wodorowych w środowisku wodnym jest zbyt mała dla ustabilizowania określonej struktury szkieletu peptydowego. Przyjmuje się, że stabilizacja wodą konformacji helisy kolagenowej jest wywołana sumą wzajemnych oddziaływań peptydowych wiązań wodorowych, wiązań hydrofobowych oraz oddziaływania wynikającego ze złożonej struktury wewnętrznej wody. Stan fizyczny wody związanej z białkiem jest z punktu widzenia energetyki stanem pośrednim między stanem stałym i ciekłym.

Na kształtowanie się struktury nadcząsteczkowej kolagenu istotny wpływ wywiera wzajemne oddziaływanie wody i grup funkcyjnych łańcuchów bocznych szkieletu peptydowego. Kolagen wiąże więc wodę poprzez grupy polarne występujące w łańcuchach bocznych oraz przez atomy N i O wiązania peptydowego. Hydratacja kolagenu badana za pomocą izoterm sorpcji, metodami rentgenograficznymi, spektroskopii w podczerwieni, NMR i relaksacji dielektrycznej nie wykazała ostrych granic między wodą silnie i słabo związaną [58–63]. Ilość wody związanej zależy od typu kolagenu i jego wieku oraz od wilgotności względnej otoczenia. Typowe wartości hydratacji kolagenu w strukturze helikalnej wynoszą 0,1 g, 0,3 g lub 0,4 g wody na 1 g kola-

T a b e l a 6. Wpływ metody pomiaru na wyniki badania hydratacji kolagenu skóry [16]

T a b l e 6. The effect of measuring method on the result of skin collagen hydration measurement [16]

Metoda oznaczania wody związanej	Zawartość wody związanej (% w stosunku do masy kolagenu)
Ciepło zwilżania	ok. 70
Prężność par	20,5–62
Stała dielektryczna	54–61
Wyżymanie pod ciśnieniem	44–47
Woda pozbawiona zdolności rozpuszczania	40–65
Obliczona z zawartości grup funkcyjnych	56,7

geny w warunkach, odpowiednio, 20%, 80% lub 90% wilgotności względnej [63].

Wpływ na wyniki ma też metoda pomiaru (tabela 6). Na podstawie badań ilości wody związanej z kolagenem ze ścięgna ogona szczura sugeruje się, że istnieje 5 stopni hydratacji tego białka [60, 61] (tabela 7).

T a b e l a 7. Różne stopnie hydratacji kolagenu ze ścięgna ogona szczura [60, 61]

T a b l e 7. Hydration degrees of rat's tail tendon collagen [60, 61]

Stopień hydratacji	Ilość wody [gH ₂ O/g kolagenu]	Charakterystyka	Sugerowany mechanizm wiązania wody
I	0–0,010	Duża energia wiązania (> 75 kJ/mol), różne położenia w cząsteczce, woda nie rotująca w NMR	Potrójne wiązania wodorowe wewnątrz potrójnej helisy obejmujące hydroksyprolinę
II	0,010–0,110	Ciepło sorpcji 71 kJ/mol, ciepło desorpcji 75 kJ/mol, woda nie rotująca w NMR	Podwójne wiązania wodorowe z możliwością umiejscowienia wewnątrz potrójnej helisy
III	0,110–0,235	Ciepło sorpcji 58 kJ/mol, ciepło desorpcji 50 kJ/mol, woda nie rotująca w NMR	Podwójne wiązania wodorowe wiążące wodę pomiędzy potrójnymi helisami i pomiędzy mikrofibrylami
IV	0,235–0,50	Ciepło sorpcji i desorpcji, ok. 38 kJ/mol, cząsteczki wody uruchomione w NMR	Woda powiązana jedynym wiązaniem wodorowym pomiędzy mikrofibrylami lub powiązana w zagłębieniach przyległych do końcowych fragmentów cząsteczki kolagenu
V	> 0,50	Woda mająca charakter cieczy	Wolna woda pomiędzy mikrofibrylami

Prowadzone w ostatnich latach badania teoretyczne dotyczące modelowych peptydów kolagenu doprowadziły do wniosku, że stabilność konformacji trójhelikalnej jest ściśle związana z obecnością hydroksyproliny i wiązań wodorowych w kolagenie. Powtarzające się mostki wodne utrzymują konformację potrójnej helisy, tworząc specyficzną strukturę hydratacji tego biopolimeru [64–67].

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ODDZIAŁYWANIA PROMIENIOWANIA UV ZE ZWIĄZKAMI ORGANICZNYMI

Związki organiczne, w których występują tylko wiązania sigma, np. C-C lub C-H, nie absorbują promie-

niowania o długości fali $\lambda > 200$ nm, nie ulegają więc przemianom fotochemicznym pod wpływem takiego promieniowania. Natomiast absorpcja promieniowania o $\lambda > 200$ nm zachodzi w związkach zawierających grupy chromoforowe, takie jak grupy karbonyłowe albo wiązania podwójne. Absorpcja jest możliwa wtedy, gdy różnica energii między dwoma poziomami energetycznymi cząsteczki jest równa energii kwantu promieniowania padającego (prawo Grotthusa—Drapera) [68]:

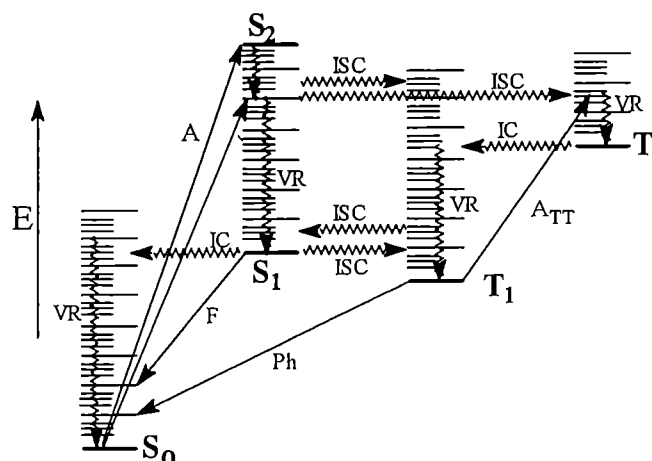
$$h\nu = \Delta E = E_2 - E_1 \quad (1)$$

gdzie: h — stała Plancka, ν — częstotliwość promieniowania, ΔE — różnica energii poziomów cząsteczki: wyższego (E_2) i niższego (E_1).

Absorpcja promieniowania prowadzi do wzbudzenia cząsteczki i przejścia jej ze stanu podstawowego do wzbudzonego stanu singletowego. Z tego ostatniego stanu cząsteczka może wrócić do stanu podstawowego w wyniku utraty energii w postaci ciepła lub światła o mniejszej energii (fluorescencja). Ze stanu singletowego cząsteczka może też przejść do wzbudzonego stanu trypletowego, tracąc część energii w postaci ciepła. Cząsteczka w stanie trypletowym jest bardziej trwała, a energię wzbudzenia może utracić również na drodze bezpromienistej (wydzielenie ciepła) lub promienistej (fosforescencja) [70] (schemat A). Energia cząsteczki w stanie trypletowym może prowadzić do rozerwania wiązania w łańcuchu polimerowym, w wyniku czego tworzą się dwa makrorodniki lub makrorodnik i rodnik, jeśli rozerwaniu uległo wiązanie w łańcuchu bocznym.

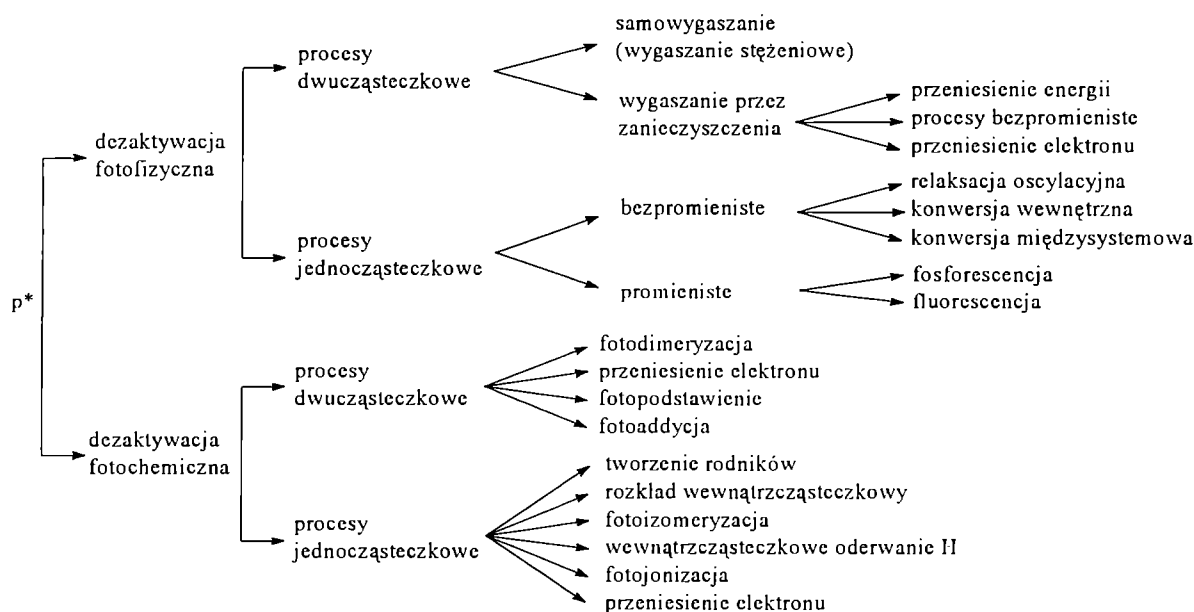
Sposób dezaktywacji stanów wzbudzonych zależy od rodzaju absorbującej cząsteczki. Większość związków

aromatycznych ulega fluorescencji, podczas gdy w związkach karbonyłowych zachodzi głównie przejście



Schemat A. Zmodyfikowany diagram Jabłońskiego; A — absorpcja promieniowa, A_{TT} — absorpcja tryplet-tryplet, F — fluorescencja, Ph — fosforescencja, IC — konwersja wewnętrzna, ISC — konwersja międzysystemowa, VR — relaksacja oscylacyjna, S_0 — stan podstawowy, S_1 i S_2 — singletowe stany wzbudzone, T_1 i T_2 — trypletowe stany wzbudzone

Scheme A. Jabłoński's modified diagram: A — radiation absorption, A_{TT} — triplet-triplet absorption, F — fluorescence, Ph — phosphorescence, IC — internal conversion, ISC — intersystem conversion, VR — oscillation relaxation, S_0 — ground state, S_1 , S_2 — excited singlet states, T_1 , T_2 — excited triplet states



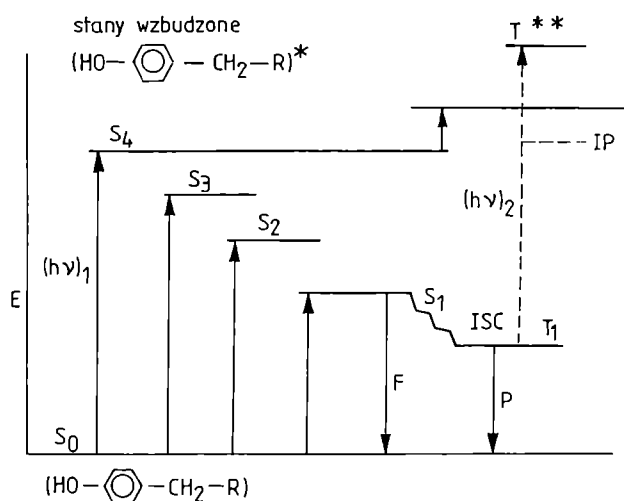
Schemat B. Dezaktywacja stanów wzbudzonych cząsteczek [71]

Scheme B. Deactivation of excited molecule states [71]

interkombinacyjne ($S^* \rightarrow T^*$). Szczegółową klasyfikację procesów dezaktywacji stanów wzbudzonych podał Duxbury [71] (schemat B).

WPLYW PROMIENIOWANIA UV NA BIAŁKA

Promieniowanie elektromagnetyczne oddziaływujące z organizmami żywymi może prowadzić do ich trwałych biologicznych uszkodzeń [73]. Skala takich uszkodzeń zależy od rodzaju i energii promieniowania, szybkości dawkowania, rodzaju i wieku napromienionego organizmu oraz jego stanu zdrowia przed napromienieniem [74, 75]. Promieniowanie o $\lambda > 240$ nm jest absorbowane przez substancję białkową dzięki zawartym w niej układom chromoforowym, takim jak wiązania peptydowe, wiązania dwusiarczkowe cystyny lub aminokwasy aromatyczne [76–78]. Absorpcja fotonu przez aminokwasy aromatyczne inicjuje serię procesów wewnątrzcząsteczkowych. Przedstawia to diagram poziomów energetycznych tyrozyny (schemat C).

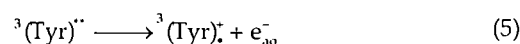
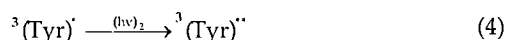


Schemat C. Diagram poziomów energetycznych tyrozyny: E — energia, S_1, S_2, S_3, S_4 — singletowe stany wzbudzone, T_1 — najniższy stan trypletowy, T^{**} — nadwzbudzony stan trypletowy, F — fluorescencja, P — fosforescencja, ISC — konwersja międzysystemowa, IP — poziom jonizacji cząsteczki tyrozyny

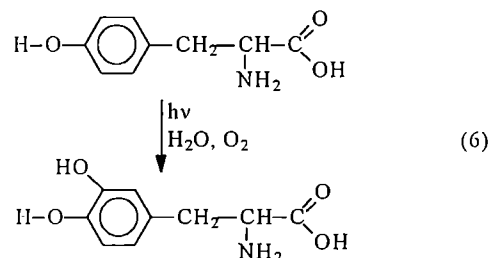
Scheme C. Diagram of energy levels in tyrosine: E — energy, S_1, \dots, S_4 — excited singlet states, T_1 — lowest triplet state, T^{**} — overexcited triplet state, F — fluorescence, P — phosphorescence, ISC — intersystem conversion, IP — ionization level in tyrosine molecule

Absorpcja fotonu może prowadzić do wzbudzonych stanów singletowych o różnych poziomach energetycznych, zależnych od długości fali zaabsorbowanego światła. Przedstawiony na schemacie C najwyższy stan singletowy tyrozyny S_4 ma, jak widać, mniejszą energię od potencjału jonizacji. Cząsteczka tyrozyny przechodzi

do najniższego stanu singletowego S_1 i na drodze interkombinacyjnej konwersji może przechodzić w najniższy stan trypletowy T_1 . Ze stanów S_1 i T_1 poprzez procesy relaksacji może ona przechodzić w stan podstawowy S_0 , emitując odpowiednio promieniowanie fluorescencyjne lub fosforescencyjne, nie prowadząc do zmian chemicznych w cząsteczce. Stan trypletowy tyrozyny ma niewystarczającą energię do dysocjacji wiązania R-OH w jej cząsteczce. Prawdopodobnie tworzy się rodnikokation i uwodniony elektron e_{aq}^- według mechanizmu wzbudzenia dwufotonowego [79]. Ciąg tych przemian przedstawiają równania (2)–(5).



Obok tych procesów może następować również rekombinacja rodnikokationu i e_{aq}^- lub reakcje wtórne pierwotnych produktów fotolizy tyrozyny. Może ona ulegać fotooksydacji, co prowadzi do wytworzenia 3,4-dihydroksyfenyloalaniny:



Promieniowanie UV może indukować również w roztworach wodnych wolnych od tlenu reakcję dekarboksylacji aminokwasów alifatycznych i peptydów. Bezpośrednie wzbudzenie tych aminokwasów prowadzi do rozerwania wiązań między atomem węgla α a atomem węgla grupy karboksylowej i do utworzenia pierwotnych rodników [77].

Badania takich procesów prowadzi się na prostych układach ze względu na trudności w otrzymaniu czystego białka [81, 82]. Tak uzyskane wyniki nie zawsze można przenieść na skomplikowane struktury biologiczne, a efekty działania promieniowania na białko *in vivo* i *in vitro* mogą wykazywać znaczne różnice [83]. Badania nad bezpośrednią reakcją fotonów UV z białkami wykazały, że energia tego promieniowania może powodować destrukcję białka polegającą bądź na przeniesieniu energii zaabsorbowanej przez układy chromoforowe do innych miejsc w łańcuchu peptydowym, bądź też na tworzeniu rodników. Przyjmuje się, że przeniesienie energii między różnymi grupami w cząsteczce białka przebiega na drodze rezonansu. Energia zaabsorbowana przez jeden aminokwas może zatem indukować zmiany fotochemiczne w innych aminokwa-

sach. W przypadku tworzenia się rodników, rodzaj i liczba tych rodników zależy od długości fali światła.

Reakcje fotochemiczne wywołują znaczne naruszenie subtelnej struktury białka. Przede wszystkim następuje rozpad struktur wyższego rzędu, a w przypadku długiego napromieniania może dojść do uszkodzenia pierwszorzędowej struktury białka. Istotną rolę w uszkodzaniu struktury białka przypisuje się też cystynie. Utworzenie w niej wzbudzonego fragmentu disulfidowego może prowadzić do naruszenia wiązań wodorowych. Destrukcyjne działanie promieniowania dotyczy także słabych wiązań hydrofobowych i elektrostatycznych. Jednocześnie z udziałem utworzonych rodników mogą powstawać nowe wiązania.

Możliwość sieciowania z jednoczesną destrukcją wiązań istniejących powoduje, że promieniowanie UV wywołuje zmiany w strukturze trzeciorzędowej i czwartorzędowej białka, a w końcu doprowadza do jej zniszczenia. Zmiany w obrębie wiązań wywołują zmianę wielu właściwości fizykochemicznych, takich jak czynność optyczna lub zmiany hydromechaniczne, które w efekcie prowadzą do zmian aktywności biologicznej.

WPLYW PROMIENIOWANIA UV NA KOLAGEN

W ramach niezbyt licznych badań nad wpływem promieniowania UV na kolagen część ich prowadzono *in vivo*, część zaś *in vitro* [84]. Do badań *in vivo* najczęściej wykorzystuje się myszy, szczury, świnki morskie i cielęta. Stwierdzono, że pod wpływem promieniowania UV w kolagenie skóry tworzą się wolne rodniki, zdolne do dalszych reakcji [85, 86]. Wynikiem tych reakcji jest wzrost gęstości i sztywności tkanki [87–89], tworzenie się zmarszczek [90] oraz pigmentacja skóry [91]. Dłuższe działanie promieniowania UV na skórę prowadzi do powstawania nowotworów [92], zmian reumatycznych [93] i zahamowania procesów gojenia się ran [94, 95].

Badania odporności fotochemicznej kolagenu wyizolowanego z organizmu prowadzono w odniesieniu do kolagenu zarówno rozpuszczalnego, jak i nierozpuszczalnego [96]. Obserwowano denaturację rozpuszczalnych odmian kolagenu wywołaną promieniowaniem UV [97]. Promieniowanie o $\lambda = 253,7$ nm powoduje wzrost ciężaru cząsteczkowego kolagenu, zwiększenie ekstynkcji przy 290–400 nm, zmniejszenie fluorescencji wywołanej przez fenyloalaninę i tyrozynę, pojawienie się nowego fluorescencyjnego pasma przy wzbudzeniu 350 nm i obniżenie temperatury denaturacji. Wskazywało to na pojawienie się nowych produktów fotodegradacji białka, nowych wiązań i nowej struktury [98, 99].

Obserwowano też w wyniku działania tego promieniowania początkowy wzrost, a następnie gwałtowne zmniejszenie lepkości i czynności optycznej kolagenu [100]. W atmosferze N_2 w kolagenie traktowanym enzymatycznie aktywność immunologiczna malała nawet po

krótkim napromienianiu, a przemiana topnienia przebiegała w szerokim przedziale temperatury, natomiast czynność optyczna nie malała, co wskazywało na zachowanie w tym czasie niezniszczonej struktury helikalnej białka.

Z badań nad rozpuszczalnym kolagenem otrzymanym w wyniku termicznej hydrolizy nierozpuszczalnego kolagenu zawartego w ścięgnie ogona szczura i wołowym ścięgnie Achillesa wynikało, że intensywność pasma fluorescencyjnego w obszarze 350–385 nm (po wzbudzeniu 300 nm) jest większa w pojedynczym niż w podwójnym łańcuchu oraz że ozon inhibituje tworzenie fibryl reagując z tyrozyną i fluoroforami 350–385 nm, a w sieciowaniu biorą udział grupy aldehydowe [101, 102].

Wykazano, że kolagen zawarty w skórze myszy sieciuje pod wpływem promieniowania o $\lambda = 320$ –400 nm i że promieniowanie to gra ważną rolę w procesie fotostarzenia [103–106]. Fotostarzenie jest sensybilizowane przez różne endogenne chromofory (np. ryboflawinę), a procesowi agregacji towarzyszy ubytek tyrozyny i histydyliny inhibitory przez O_2 . Obserwowano również sieciowanie kolagenu I i IV zachodzące pod wpływem promieniowania o $\lambda = 290$ –320 nm (UVB), z równoczesnym ubytkiem tyrozyny, a w kolagenie IV malała m.in. zawartość histydyliny i metioniny, powstawała natomiast 3,4-dihydroksyfenylalanina (DOPA), która może brać udział w starzeniu skóry.

Porównanie wyników wywołanych promieniowaniem o $\lambda = 254$, 335–400 i 290–400 nm w kolagenie I ze skóry cielęcej wskazało na zanik fluorescencji, a więc na nietrwałość fluorescencyjnych chromoforów. Jednocześnie powstawały nowe fluorofory z emisją przy 360 nm i szeroką emisją przy 430–435 nm [107].

W peptydach, które otrzymano w wyniku rozkładu kolagenu obserwowano polimeryzację sieciującą wywołaną przez rodniki hydroksylowe i ozon [108]. Zauważono również degradację w roztworze tych peptydów i przypisano to działaniu rodnika OH^\cdot powstającego w wyniku rozkładu O_3 w wodzie, katalizowanego przez jony OH^- i zależnego od pH roztworu. Starzenie się kolagenu *in vitro* wynika z fotosieciovania i z fotochemicznego utleniania [109]. Rezultatem jest zmiana właściwości mechanicznych i termodynamicznych kolagenu [110]. Wykazano, że stopień usieciovania kolagenu wzrasta w obecności cukrów [111–113].

Analiza składu aminokwasowego kolagenu wskazała, że pod wpływem promieniowania UV maleje zawartość aminokwasów aromatycznych [114]; powstają z nich nowe związki, takie jak dityrozyna lub 3,4-dihydroksyfenyloalanina [107]. Jednak nie o każdej długości fali promieniowanie UV powoduje rozpad aminokwasów aromatycznych. Wykazano, że w kolagenie ze skóry cielęcej taka destrukcja następuje pod wpływem UVC (254 nm), natomiast UVA (366 nm) i promieniowanie słoneczne nie wywołują podobnej przemiany. Przebieg reakcji fotochemicznych jest w znacznym stopniu

zależny od obecności w kolagenie innych substancji [104, 114–121].

Rozbieżność uzyskanych przez różnych autorów wyników dotyczących przemian fotochemicznych w kolagenie jest skutkiem odmiennych warunków badań oraz stosowania kolagenu wypreparowanego z różnych tkanek i różnymi metodami.

Pełniejszy i kompleksowy informacji o jakościowych oraz ilościowych przemianach fotochemicznych w kolagenie dostarczyły prace z ostatnich lat [96, 117–130]. Było to możliwe dzięki wykorzystywaniu takiego samego rodzaju kolagenu (ze ścięgien ogona szczura) i takiego samego źródła promieniowania o $\lambda = 253,7$ nm, jak również zastosowaniu wielu różnorodnych metod badawczych (derywatografii, FTIR, polarymetrii, wiskozymetrii, UV-VIS, dichroizmu, DSC, skaningowej mikroskopii elektronowej, GPC, chromatografii cienkowarstwowej), co pozwoliło na potwierdzenie lub eliminację wyników bądź sugestii płynących z jednego rodzaju pomiarów.

Metodą analizy derywatograficznej ustalono np., że energia aktywacji procesów termicznego rozkładu kolagenu i masa produktów rozkładu zachodzącego na II i III etapie jest w próbkach napromienionych mniejsza niż w nienapromienionych. Wskazywało to na fotochemiczne osłabienie wiązań oraz na ulotnienie się części produktów fotolizy białka już podczas jego napromieniania [118].

Etap I termicznego rozkładu kolagenu — zachodzący w temperaturze niższej od 100°C z 2–3-krotnie mniejszą energią aktywacji niż na etapach II i III — wskazywał na odparowywanie wody niezwiązanej z kolagenem. Większy w próbkach napromienionych ubytek masy sugerował, że część wody związanej z białkiem wiązaniami wodorowymi została uwolniona w wyniku ich fotolizy i na I etapie odparowana wraz z wodą pierwotnie niezwiązaną.

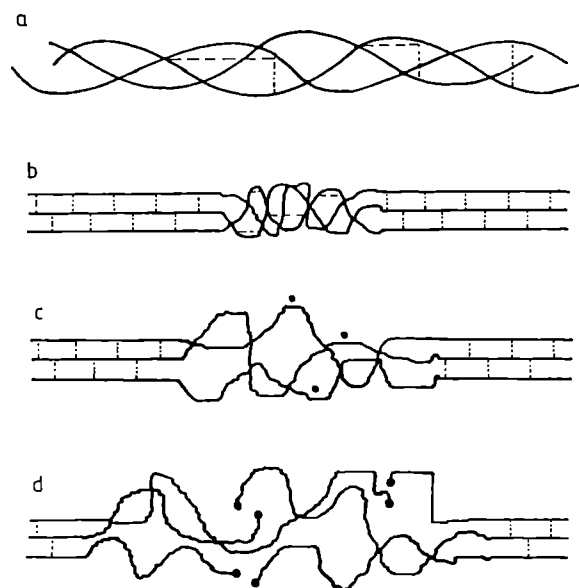
Te wstępne informacje zostały potwierdzone wynikami analizy FTIR. Po raz pierwszy w badaniach białka zastosowano w widmach FTIR rozkład pasm amidowych na składowe. Zmiany pola tych pasm składowych wywołane promieniowaniem UVC wykazały, że pod wpływem tego promieniowania gwałtownie maleje zawartość wody związanej z kolagenem oraz maleje liczba wiązań peptydowych, grup COOH, C=O i COO⁻ [119].

Wszystko to są czynniki odpowiedzialne za udział wiązań wodorowych decydujących o uporządkowanej strukturze helikalnej kolagenu. Konsekwencją wyżej wymienionych zmian winno być zniszczenie tej struktury i przejście z niej białka w strukturę kłębką statystycznego. Zostało to potwierdzone gwałtownym zmniejszeniem czynności optycznej i lepkości, wzrostem absorbancji w widmie UV-VIS przy 278 nm oraz zmniejszeniem stosunków dichroicznych pasm amidowych A i I ze zbliżeniem ich wartości do wartości 1, co oznacza zniszczenie uporządkowanej struktury białka. Jest to zgodne z przesunięciem do odpowiednio niższej

temperatury maksimum na krzywej DSC (charakteryzującej koagulację białka) [96, 117, 119, 120]. Również na obrazie mikroskopowym wyraźnie widoczne początkowo włókienka zanikały po napromienieniu błony kolagenowej.

Analiza FTIR wskazała na zmniejszanie się zawartości ugrupowań $-\text{CH}_2-$ i grup $-\text{CH}_3$ w napromienianym kolagenie, co jest dowodem fotodegradacji białka z rozerwaniem w nim — oprócz wiązań peptydowych — wiązań C-C. W konsekwencji powinien zmaleć ciężar cząsteczkowy polimeru. Potwierdziły to badania metodą GPC: przesunięcie krzywej GPC w obszar mniejszych ciężarów cząsteczkowych, jej spłaszczenie oraz obniżenie maksimum.

Obok wyżej wymienionych zmian w strukturze i uporządkowaniu jak również przebieganiu degradacji z rozerwaniem wiązań CO-NH i C-C oraz destrukcji z odrywaniem grup COOH, C=O, COO⁻ wykazano, że przemiany fotochemiczne zachodzą też w cząsteczkach aminokwasów. Wskazywał na to zanik w napromienianym kolagenie pasma fluorescencyjnego z maksimum przy 305 nm i pojawienie się szerokiego słabego pasma w obszarze 400–500 nm, co oznacza przemianę fotochemiczną tyrozyny w pochodne tego aminokwasu. Fotodegradacja kolagenu zachodzi stopniowo (rys. 2). Za-



Rys. 2. Stopniowy przebieg fotodegradacji kolagenu
Fig. 2. The course of progressive photodegradation of collagen

absorbowane promieniowanie początkowo powoduje rozluźnienie struktury tego białka, a następnie całkowitą jego degradację.

Przebieg i wydajność wymienionych w pracach [117–124] przemian zachodzących w kolagenie obserwowano równolegle w próbkach tego białka z różnymi dodatkami. Stwierdzono, że β -karoten, melaniny oraz witamina E opóźniają i zmniejszają wydajność prze-

mian fotochemicznych [117, 120, 122, 126]. Wskazuje to, że związki te są nie tylko wygaszczaczami $^1\text{O}_2$, ale i skutecznymi fotostabilizatorami kolagenu. Działanie β -karotenu wynika głównie z wykorzystania energii zaabsorbowanej przez ten związek na izomeryzację *cis-trans* jego cząsteczki, zaś działanie fotostabilizujące melanin polega przede wszystkim na rozpraszaniu padającej energii. Natomiast glutation i błękit metylenowy przyspieszają reakcje fotochemiczne w kolagenie [127, 130]. Jest to skutkiem faktu, że związki te dzięki grupom chromoforowym pochłaniają dodatkową porcję energii i tworzą rodniki inicjujące kolejne przemiany fotochemiczne w kolagenie.

Badania przemian fotochemicznych w kolagenie nie stanowią zamkniętego już rozdziału w poznawaniu tego białka, nie do końca bowiem są poznane produkty tych przemian oraz ich mechanizmy. Dodatkowe utrudnienie stanowi duża różnorodność typów kolagenu, które mogą zachowywać się rozmaicie pod wpływem promieniowania o takiej samej długości fali. W świetle dotychczasowych badań nad fotostabilnością kolagenu jedno wiadomo na pewno — jest ono szkodliwe zarówno dla organizmów, w których występuje kolagen, jak i dla produktów zawierających to białko (kosmetyki, biomateriały) powszechnie stosowanych w życiu codziennym.

LITERATURA

[1] Paszyc S.: „Podstawy fotochemii”, PWN, Warszawa 1983, str. 182. [2] Frederick J. E., Diaz S. B., Smolskaya J., Esposito W., Lucas T., Both C. R.: *Photochem. Photobiol.* 1994, **60**, nr 4, 356. [3] Zerefos C. S., Meleti C., Bals A. F., Lambros A.: *J. Photochem. Photobiol. B (Biology)* 1995, **31**, 15. [4] McKenzie R. L., Blumthaler M., Booth C. R., Diaz S. R., Frederick E. J.: UNEP/WMO „Scientific Assessment of Ozone Depletion”, rozdz. 9. „Surface Ultraviolet Radiation”, United Nations Environment Programme, Nairobi (Kenia) 1994. [5] Shuitemaker J. J., Boras P., van Leegoed H. L., van der Meulen F. Star W., van Zandwijk N.: *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 1996, **34**, 3. [6] Giacomoni P. U., Alessio P. D.: *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 1996, **33**, 267. [7] Coohill T. C., Hader D. P., Mitchell D. L.: *Photochem. Photobiol.* 1996, **64**, nr 3, 401. [8] Andley U. P., Weber J. G.: *Photochem. Photobiol.* 1996, **62**, nr 5, 840. [9] Gilcrest B. A., Park H. Y., Eller M. S., Yaar M.: *Photochem. Photobiol.* 1996, **63**, nr 1, 1. [10] Caldwell M. M., Flint S. D.: *Clin. Change* 1994, **28**, 375. [11] Marks R., Staples M., Giles G. G.: *Int. J. Cancer* 1993, **53**, 585. [12] Karter J.: „Biochemia”, PWN, Warszawa 1988, str. 45. [13] Stryer L.: „Biochemia”, PWN, Warszawa 1986, str. 215. [14] Reich G.: „Kolagen”, WNT, Warszawa 1970, str. 33. [15] Chvapil M., Hurych J.: *Kožarstvi* 1962, **12**, 293. [16] Lasek W.: „Kolagen — chemia i wykorzystanie”, WNT, Warszawa 1978, str. 13. [17] Gathercole L. J., Keller A.: *Matrix* 1991, **11**, 214. [18] Parry D. A.: *Biophys. Chem.* 1988, **29**, 195. [19] Woo S.

L.-Y., Newton P. O., MacKenna D. A., Lyon R. M.: *J. Biomech.* 1992, **25**, 377. [20] Bailey A. J., Paul R. G., Knott L.: *Mechanisms of Ageing and Development* 1998, **106**, 1.

[21] Rothbard S., Watson R. F.: *J. Exp. Med.* 1965, **122**, 441. [22] Bańkowski E., Pałka J.: *Post. Biochem.* 1989, **35**, nr 3, 389. [23] Van der Rest M., Garrone R.: *FASEB J.* 1991, **5**, 2814. [24] Bowes J., Moss J.: *Biochem. J.* 1953, **55**, 735. [25] Bender E., Silver F.: *Biopolymers* 1985, **24**, 2195. [26] Dolz R., Heidemann E.: *Biopolymers* 1986, **25**, 1069. [27] Germann H. P., Heidemann E.: *Biopolymers* 1988, **27**, 157. [28] Jones E. Y., Miller A. J.: *J. Mol. Biol.* 1991, **218**, 209. [29] Long C. G., Thomas M., Brodsky B.: *Biopolymers* 1995, **35**, 621. [30] Fasold H.: „Budowa białek”, PWN, Warszawa 1977, str. 285.

[31] Harrington W.: *J. Mol. Biol.* 1964, **9**, 13. [32] Goodman M., Feng Y., Melacini G., Taulane J. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 5156. [33] Ricard-Blum S., Ville G.: *Cell. Mol. Biol.* 1988, **34**, nr 6, 581. [34] Rigby B. J., Mitchell T. W., Robinson S. M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1977, **79**, 2. [35] Wess T. J., Miller A., Bratshaw J. P.: *J. Mol. Biol.* 1990, **213**, 1. [36] Bruns R. R., Gross J.: *Biochemistry* 1973, **12**, 808. [37] Sasieskhanza V., Bansal M.: *Current Sci.* 1990, **59**, 865. [38] Volpi M., Katz E. P.: *J. Biomechanics* 1991, **24**, 67. [39] Prockop D. J., Fertala A.: *J. Struct. Biol.* 1998, **122**, 111. [40] Pecharova I.: *Vlakna Textil* 1994, **3**, 139.

[41] Pticyn O., Eizner E.: *Biofizyka* 1965, **10**, 3. [42] Wright B., Wiederham N.: *J. Polym. Sci.* 1951, **7**, 105. [43] Bigi A.: *Int. J. Biol. Macromol.* 1987, **9**, 363. [44] Lim J. J., Shamos M. H.: *Biopolymers* 1974, **13**, 1791. [45] Miles C. A.: *Int. J. Biol. Macromol.* 1993, **15**, 265. [46] Bailey A. J., Sims T. J., Avery N. C., Miles C. A.: *Biochem. J.* 1993, **296**, 48. [47] Miles C. A., Burjanadze T. V., Bailey A. J.: *J. Mol. Biol.* 1995, **245**, 437. [48] Miles C. A., Knott L., Sumner I. G., Bailey A. J.: *J. Mol. Biol.* 1997, **277**, 135. [49] Miles C. A., Bailey A. J.: *Proc. Indian. Acad. Sci. (Chem. Sci.)* 1999, **111**, 71. [50] Wallace D. G., Candell R. A., Donovan J. W.: *Biopolymers* 1986, **25**, 1875.

[51] Rooney P., Grant M. E., McClure J.: *Matrix* 1992, **12**, 274. [52] Petite H., Frei V., Huc A., Herbage D.: *J. Biomed. Mater. Res.* 1994, **28**, 159. [53] Komsa-Penkova R., Goshev L., Aleksandrova Tz.: Scientific Works of the Medical University of Pleven, Bułgaria, 1995, str. 5. [54] Hauschka P. V., Harrington W. F.: *Biochemistry* 1970, **9**, nr 19, 3734. [55] Bańkowski E.: *Post. Biochem.* 1982, **28**, nr 3, 301. [56] Bailey A. J., Paul R. G.: *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 1998, **82**, 104. [57] Tait M., Franks F.: *Nature* 1971, **230**, 91. [58] Luscher-Matti M., Ruegg M.: *Biopolymers* 1982, **21**, 403. [59] Cusack S.: *Biopolymers* 1984, **23**, 337. [60] Traore A., Foucat L., Renou J. P.: Materiały konferencyjne „Biological Macromolecular Dynamics”, Grenoble (Francja) 1996.

[61] Pineri M. H., Escoubes M., Roche G.: *Biopolymers* 1978, **17**, 2799. [62] Mezgani D.: *J. Polym. Sci. Part B, Polym. Phys.* 1995, **33**, 2413. [63] Pineri M. H.: *Polymer* 1975, **16**, 595. [64] Bella J., Brodsky B., Berman H. M.: *Structure* 1995, **3**, 893. [65] Bella J., Berman H. M.: *J. Mol. Biol.* 1996, **254**, 734. [66] Kramer R. Z., Berman H. M.: *J.*

- Biomol. Structure Dynamics* 1998, **16**, 367. [67] Kuznetsova N., Rau D. C., Parsegian V. A., Leikin S.: *Biophys. J.* 1997, **72**, 353. [68] Rabek J. F.: „Photodegradation, Photooxidation and Photostabilization of Polymers”, Wiley, Londyn 1975. [69] Rabek J. F.: „Polymer Photodegradation”, Chapman@Hall, Londyn 1995. [70] Polskie Towarzystwo Chemiczne: „Glosariusz terminów stosowanych w fotochemii”, Wrocław 1992.
- [71] Duxbury D. F.: *Chem. Rev.* 1993, **93**, 381. [72] Cicchetti O.: *Adv. Polymer. Sci.* 1970, **7**, nr 1, 70. [73] Szymański W.: „Chemia jądrowa. Skrypty i teksty pomocnicze” UMK, Toruń 1986, str. 315. [74] Cox N. H., Diffey B. L., Farr P. M.: *Br. J. Dermatol.* 1992, **126**, nr 4, 315. [75] Webb A. R.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995, **31**, 9. [76] Baltrop J. A., Coyle J. D.: „Fotochemia”, PWN, Warszawa 1987. [77] Noworytko J., Klein A.: Materiały V Seminarium Instytutu Biologii Molekularnej UJ, Rabka 1974, str. 107. [78] Dodanova N. Y.: *J. Photochem. Photobiol.* 1993, **18**, 111. [79] Kierdaszuk B., Gryczyński J., Modrak-Wójcik A., Bzowska A., Shugar D., Lakowicz J. L.: *Photochem. Photobiol.* 1995, **61**, nr 4, 319. [80] Vladimirov Ya. A.: *Photochem. Photobiol.* 1965, **4**, 369.
- [81] Garmann H. P., Heidemann E.: *Biopolymers* 1988, **27**, 157. [82] Bender E., Silver F. H.: *Biopolymers* 1988, **27**, 257. [83] Żak Z.: *Post. Biochem.* 1980, **26**, 313. [84] Gilchrist B. A.: *J. Am. Acad. Dermatol.* 1989, **21**, nr 3, 630. [85] Jurkiewicz A. A., Buettner G. R.: *Photochem. Photobiol.* 1994, **59**, nr 1. [86] Maeda K., Naganuma M., Fukuda M.: *Photochem. Photobiol.* 1991, **54**, nr 5, 737. [87] Chatterjee R., Benzinger M. J., Ritter J. L., Bisset D. L.: *Photochem. Photobiol.* 1990, **51**, nr 1, 91. [88] Pfau R. G., Hood A. F., Morison W. L.: *Br. J. Dermatol.* 1986, **114**, nr 3, 319. [89] Fourtanier A., Berrebi C.: *Photochem. Photobiol.* 1989, **50**, nr 6, 771. [90] Moloney S. J., Learn D. B.: *Photochem. Photobiol.* 1992, **56**, nr 4, 495.
- [91] Holzle E.: *Br. J. Dermatol.* 1992, **127**, nr 1, 48. [92] Guercio-Hauer C., Macfarlane D. F., Deleo V. A.: *Am. Fam. Physician.* 1994, **50**, nr 2, 327. [93] O'Brien J. P., Regan W.: *J. Am. Acad. Dermatol.* 1991, **24**, nr 5, 765. [94] Dubrovskaya V. F.: *Radiobiologia* 1991, **31**, 485. [95] Bisset D. L., McBride J. F., Hannon D. P., Patrick L. F.: *J. Photochem. Photobiol. B* 1991, **9**, nr 3—4, 323. [96] Sionkowska A., Kamińska A.: *Int. J. Biol. Macromol.* 1999, **24**, 337. [97] Copper D. R., Davidson R. J.: *Biochem. J.* 1965, **97**, 139. [98] Fujimori E.: *Biopolymers* 1965, **3**, 115. [99] Fujimori E.: *Biochemistry* 1966, **5**, 1034. [100] Miyata T., Sohde, Robin A. L., Stenzel K. H.: *Biochim. Biophys. Acta* 1971, **229**, 672.
- [101] Crabtree D. V., Fujimori E.: *Biopolymers* 1980, **19**, 1081. [102] Fujimori E.: *Eur. J. Biochem.* 1985, **152**, 299. [103] Kato Y., Uchida K., Kawakishi S.: *J. Agric. Food Chem.* 1992, **40**, 373. [104] Kato Y., Uchida K., Kawakishi S.: *Photochem. Photobiol.* 1994, **59**, nr 3, 343. [105] Kato Y., Nishikawa T., Kawakishi S.: *Photochem. Photobiol.* 1995, **61**, nr 4, 367. [106] Kato Y., Uchida K., Kawakishi S.: *J. Biol. Chem.* 1992, **267**, 23646. [107] Menter J. M., Williamson G. D., Carlyle K., Moore C. L., Willis I.: *Photochem. Photobiol.* 1995, **62**, nr 3, 402. [108] Kano Y., Sakano Y., Fujimoto E.: *J. Biochem.* 1987, **102**, 839. [109] Fujimori E.: *FEBS Lett.* 1988, **98**, 236. [110] Gassan A. I.: *Biofizyka* 1988, **33**, 772.
- [111] Tanaka S.: *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, nr 33, 1765. [112] Hicks M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, **249**, nr 1, 268. [113] Brennam M. J.: *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, nr 35, 20953. [114] Ramshaw J. A. M., Stephens L. J., Tulloch P. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1994, **1206**, 225. [115] Elmets C. A., Vargas A., Oresajo C.: *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1992, **9**, nr 3, 113. [116] Bisset D. L., Majeti S., Fu J. J., McBride J. F., Wyder W. E.: *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1990, **7**, nr 2, 63. [117] Kamińska A., Sionkowska A.: *Polimery* 1994, **39**, 458. [118] Kamińska A., Sionkowska A.: *Polym. Deg. Stab.* 1996, **51**, nr 1, 15. [119] Kamińska A., Sionkowska A.: *Polym. Deg. Stab.* 1996, **51**, nr 1, 19. [120] Kamińska A., Sionkowska A.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1996, **96**, 123.
- [121] Kamińska A., Sionkowska A.: „Metody i techniki pomiarowe w spektroskopii oscylacyjnej”, Wyd. Akapit, Kraków 1998, str. 159. [122] Sionkowska A., Kamińska A.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1999, **120**, 207. [123] Sionkowska A.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1999, **124**, 91. [124] Kamińska A., Sionkowska A.: *Polym. Deg. Stab.* 1999, **65**, 87. [125] Sionkowska A., Miles C. A., Sims T. J., Avery N. C., Bailey A. J.: International Conference: „Macromolecules'99”, wrzesień 1999, Bath, Wielka Brytania. [126] Torikai A., Shibata H.: *J. Appl. Polym. Sci.* 1999, **73**, 1257. [127] Sionkowska A.: *Polym. Deg. Stab.* 2000, **67**, 79. [128] Sionkowska A.: *Polym. Deg. Stab.* 2000, **68**, 147. [129] Miles C. A., Sionkowska A., Hulin S. L., Sims T. J., Avery N. C., Bailey A. J.: *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 33014. [130] Sionkowska A.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2000 (w druku).

Otrzymano 29 III 2000 r.