

OCENA WPŁYWU PROMIENIOWANIA UV NA KOLAGEN RYBI METODAMI SPEKTROSKOPOWYMI

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA,
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA
MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 37-38*]

Wstęp

Kolagen, najbardziej rozpowszechniony biopolimer w organizmie człowieka, jest uważany za jeden z najbardziej użytecznych biomateriałów naturalnych. Białko to jest łatwo dostępne, nietoksyczne, dlatego stanowi doskonałą bazę dla biomateriałów [1,2]. Kolagen rybi może być cennym i bezpiecznym substytutem kolagenu wołowego i wieprzowego do zastosowań biomedycznych i farmaceutycznych. Kolagen rybi charakteryzuje się niskim ryzykiem zakażenia chorobotwórczymi patogenami, takimi jak gąbczasta encefalopatia bydła (BSE) [3]. Właściwości fizyczne biomateriałów na bazie kolagenu, jak również szybkość ich resorpcji, czy też degradacji można poprawić poprzez sieciowanie. Powstawanie wiązań sieciujących można osiągnąć stosując zarówno chemiczne, jak i fizyczne czynniki sieciujące. Jednym z fizycznych czynników sieciujących jest promieniowanie UV. Promieniowanie UV stosuje się też w celach modyfikacji właściwości powierzchniowych, jak również do sterylizacji biomateriałów [4].

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu promieniowania UV na kolagen wyizolowany z łusek ryb. Kolagen został poddany działaniu promieniowania UV. Zachodzące zmiany zanalizowano metodami spektroskopii UV-VIS oraz FTIR.

Materiały i metodyka

Kolagen wyizolowano z łusek rybich (*Esox Lucius*), poprzez demineralizację oraz rozpuszczenie w kwasie octowym [5]. Filmy kolagenowe uzyskano metodą odparowania rozpuszczalnika. Filmy suszono w powietrzu, w temperaturze pokojowej.

Filmy poddano działaniu promieniowania UV. Źródłem promieniowania UV była niskociśnieniowa lampa rtęciowa TUV 30 W (Philips, Holandia), emitująca głównie promieniowanie $\lambda=254$ nm o natężeniu $0,263$ J/cm²min.

Widma filmów kolagenowych zarejestrowano na spektrofotometrze Genesis II FTIRTM firmy Mattson. Pomiarów dokonywano bezpośrednio po naświetlaniu próbek, w temperaturze pokojowej i w atmosferze powietrza.

Roztwór kolagenu umieszczony w kwarcowej kuwecie poddano działaniu

SPECTROSCOPIC STUDIES INTO THE INFLUENCE OF UV RADIATION ON FISH COLLAGEN

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
FACULTY OF CHEMISTRY, GROUP OF BIOPOLYMERS,
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND
MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[*Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 37-38*]

Introduction

Collagen, the most prevalent structural biopolymer in the human body, is regarded as one of the most useful natural biomaterials. Collagen is readily available, non-toxic and provides an excellent basis for biomaterials [1,2]. Fish collagen can be a useful and safe substitute for bovine and pig collagens for biomedical and pharmaceutical applications. Fish collagen should have a relatively low risk of possessing unknown pathogens such as bovine spongiform encephalopathy (BSE) [3]. The crosslinking process improves the physical properties of collagen-based biomaterials as well as their resorption/degradation rate. Synthetic crosslinks can be achieved using either chemical crosslinking agents or physical crosslinking methods. Physical crosslinking can be achieved by UV irradiation. UV radiation is widely used in biomaterials science for surface modification and sterilization [4].

The aim of this work was to study the influence of UV irradiation on collagen extracted from fish scales. Collagen solutions and/or films were irradiated and the UV-Vis absorption and FTIR spectra were recorded.

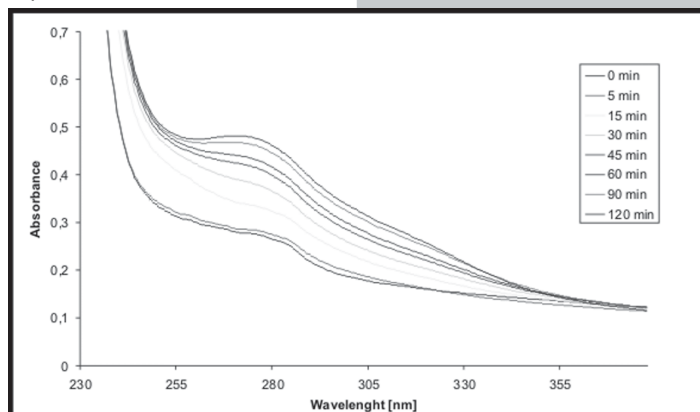
Materials and methods

Collagen was extracted from fish scale (*Esox Lucius*), a calcified tissue, through demineralization following acetic acid treatment [5]. Collagen films were prepared by solution casting onto glass plates. After solvent evaporation, the samples were dried in vacuum at room temperature.

Air-dried collagen films were submitted to treatment with UV irradiation for different time intervals, in air at room temperature using a mercury lamp, Philips TUV-30, which emits light of mainly 254 nm wavelength. The intensity of radiation was 0.263 J/cm²min.

The IR spectra of films were obtained using a Mattson Genesis II spectrophotometer. All spectra were recorded in absorption mode at 4 cm⁻¹ intervals and 16 scans.

Irradiation experiments were carried out in a quartz cuvette at a distance of 3 cm from the light source. The UV-Vis absorption spectra of collagen, before and immediately after UV irradiation were recorded with a Shimadzu spectrophotometer (Model UV-1601PC). All meas-



RYS. 1. Widma UV-VIS kolagenu rybiego przed i po naświetlaniu.
FIG. 1. UV-VIS spectra of fish collagen before and after UV irradiation.

niu promieniowania UV, w odległości 3 cm od źródła światła. Widma UV-VIS przed i bezpośrednio po napromienianiu UV zostały zarejestrowane za pomocą spektrofotometru Shimadzu (Model UV-1601PC). Wszystkie pomiary zostały wykonane w tych samych warunkach temperatury i wilgotności.

Wyniki i dyskusja

Widma absorpcyjne w zakresie widzialnym i nadfioletowym roztworu kolagenu po różnych czasach naświetlania przedstawiono na RYS.1.

W wyniku napromieniania roztworu kolagenu następuje wzrost absorpcji w maksimum absorpcji przy 278 nm. Obserwowane zmiany spowodowane są zmianami konformacyjnymi kolagenu oraz przemianami aminokwasów aromatycznych.

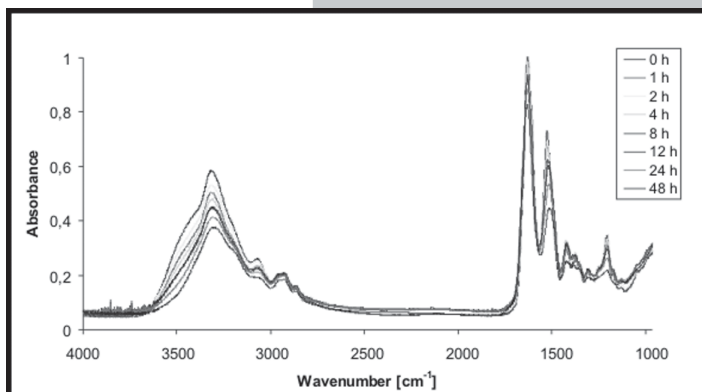
Widma FTIR kolagenu rybiego przedstawiono na RYS.2. Jak widać z RYSUNKU 2 pasma amidowe uległy przesunięciu pod wpływem promieniowania UV. W szczególności położenie pasma amidowego A uległo wyraźnemu przesunięciu w kierunku niższych częstotliwości (TABELA 1). Świadczy to o zmianach konformacyjnych w cząsteczce kolagenu oraz ubytku wody z nim związanej. Po ekspozycji na promieniowanie UV zaobserwowano zmniejszenie pól powierzchni pasm amidowych (TABELA 2), co wskazuje na zachodzącą fotodegradację kolagenu.

Wnioski

Materiały na bazie kolagenu rybiego mogą być sterylizowane i modyfikowane promieniowaniem UV. Jednak, w wyniku działania tego promieniowania, następuje rozrywanie wiązań wodorowych stabilizujących strukturę potrójnej helisy, co prowadzi do zmian konformacji i przejścia cząsteczek kolagenu ze struktury helikalnej w strukturę kłębką statystycznego. Fotodegradacja kolagenu wynika z rozrywania wiązań peptydowych, a także z powstawania nowych produktów przemian fenylalaniny i tyrozyny.

Piśmiennictwo

- [1] S.N. Lakshmi, T.L. Cato. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007;32:762-798.
- [2] C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;221:1-22.
- [3] M. Zhang, W. Liu, G. Li. Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarrel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry* 2009;115:826-831.



RYS. 2. Widma FTIR kolagenu rybiego przed i po napromienianiu UV.

FIG. 2. FTIR spectra of fish collagen before and after UV- irradiation.

TABELA 1. Położenie pasm amidowych w widmie kolagenu po różnych czasach naświetlania UV.

TABLE 1. Amide band position for collagen before and after UV- irradiation.

Pasma amidowe Band	Położenie pasm przed i po naświetlaniu UV [cm ⁻¹] Position of the band [cm ⁻¹] after UV- irradiation							
	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
A	3324	3320	3319	3318	3315	3314	3311	3305
B	3081	3082	3081	3079	3078	3078	3078	3078
I	1658	1658	1658	1658	1659	1658	1658	1658
II	1554	1552	1554	1550	1547	1545	1540	1540

TABELA 2. Pola powierzchni pasm amidowych w widmie kolagenu po różnych czasach naświetlania.

TABLE 2. Amide bands integral intensity for collagen before and after UV- irradiation.

Pasma amidowe Band	Pola powierzchni pasm przed i po naświetlaniu UV [cm ⁻¹] The area of band after UV- irradiation							
	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
A + B	138	129	118	98,1	89,1	88,4	77,6	69,3
I	43,8	42,8	42,4	41,2	40,3	39,9	38,4	37,5
II	21,6	21,2	21,1	19,9	19,2	17,9	15,0	10,7

urements were performed in the same conditions of temperature and humidity.

Results and discussion

UV-VIS spectra of collagen are presented in FIG.1.

After UV irradiation of fish collagen we observed an increase of absorbance at 278 nm due to the conformational alterations of collagen and to photochemical reactions of aromatic amino acids responsible for this absorption. FTIR spectra of collagen are shown in FIG.2.

We observed shift of the position of the amide bands. Especially the amide band A has been shifted to lower frequencies (TABLE 1). This fact suggest the conformational alterations of collagen molecule and the loss of water bonded to collagen. The drop of integral intensity of all amide bands in collagen during UV irradiation was observed (TABLE 2). It is an evidence of degradation of collagen by UV-irradiation.

Conclusions

Fish collagen-based materials can be sterilized and

modified by UV-irradiation. However, UV radiation induces destruction of the hydrogen bonds, which are formed between the helix of collagen molecule and leads to partial destruction of the triple helix structure of collagen molecule to the random coil structure. Photodegradation of fish collagen results in the scission of peptide linkage and formation of new photoproducts from tyrosine and phenylalanine.

References

- [4] R. Parentau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials* 2010;3:1863-1887.
- [5] J. Kozłowska, A. Sionkowska. Isolation and characterization of collagen from fish (*Esox Lucius*) scale". *Engineering of Biomaterials/Inżynieria biomateriałów* 2011;14:24-26.