

УДК 612.67 575.7+616.092

©Коллектив авторов

## БИОХИМИЧЕСКОЕ И ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИКАЦИИ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА ПРИ УФ-ОБЛУЧЕНИИ

*Г.А. Реброва\*, В.К. Василевский, Л.Б. Ребров, Л.А. Осипова, В.А. Быков*

Научно-исследовательский и учебно-методический центр биомедицинских технологий, 123056, Москва, ул. Красина 2; тел.: 254-11-93; факс: (495) 254-56-81; эл. почта: galinarebrova@mtu-net.ru; nicbmtvilar@mtu-net.ru

Изучено влияние УФ-облучения радиации (270-380 нм) на биохимические, флуорометрические и колориметрические свойства коллагена. Длительное облучение (120 часов) сопровождается повышением структурной стабильности коллагена к действию специфических и неспецифических протеолитических ферментов, образованием новых дополнительных флуорофор – содержащих соединений, увеличением количества карбониллов в молекуле коллагена и значительным изменением характера распределения продуктов щелочного гидролиза белка при гель - хроматографическом анализе. Изменяются координаты цвета исследуемых коллагеновых пленок. Эти изменения коллагена показали, что при УФ-облучении происходят фотомодифицирующие и фотоокислительные процессы в структуре белка.

**Ключевые слова:** коллаген, УФ-облучение, фотохимия, фотостарение.

**ВВЕДЕНИЕ.** Коллаген является одним из наиболее функционально значимых белков в теле человека и играет важную роль в морфогенезе, развитии и старении большинства органов и тканей человека (кожа, сухожилия, костная и хрящевая ткань, зубы, стенки кровеносных сосудов) [1, 2]. В частности, коллаген – основной фибриллярный белок кожи человека, и в дерме кожи его содержание составляет 80% от сухого веса ткани [3].

Состояние коллагена в коже представляется чрезвычайно важным для различных биомедицинских и косметических целей и для понимания патогенеза различных реакций, сопровождающих старение кожи.

Важным фактором, влияющим на процесс старения коллагена кожи, является воздействие на нее УФ-излучения, присутствующего в спектре солнечного излучения, состоящего, как известно, из видимого света, инфракрасной области излучения и УФ областей, характеризующихся тремя диапазонами спектра: УФ–А (320-400 нм), УФ–В (290-320 нм) и УФ–С (220-290 нм) [4, 5].

УФ–С обычно блокируется озоновым слоем атмосферы, а УФ–В и УФ–А, имеющие более длинноволновый спектр, могут активно действовать на кожу человека, вызывая эритему, карциногенез и другие морфобиохимические изменения кожи [6, 7].

Хотя интерес к фотостарению коллагена имеет широкий теоретический и практический характер, проводимые в настоящее время в мире исследования по изучению воздействия светового излучения на коллаген кожи или растворы коллагена, представлены в литературе порой очень противоречивыми данными, особенно это касается облучения экспериментального материала в отдельных областях спектра солнечного излучения – УФ-А и УФ-В [8, 9]. Авторы связывают это с разными экспериментальными условиями облучения: использования различных типов УФ-ламп, продолжительность и дозы светового воздействия [10].

\* - адресат для переписки

Однако, на наш взгляд, в указанной проблеме отсутствует единый комплексный методический подход к анализу фотохимической модификации коллагена на молекулярном и надмолекулярном уровнях, включающей оценку процесса фотодеструкции, фототрансформации, фотоокисления, протекающих в белке как под влиянием отдельно УФ-А и УФ-В, так и под воздействием суммарно-совокупного широкого спектра УФ-А и УФ-В.

Целью настоящего исследования являлось комплексное биохимическое и фотометрическое изучение возможной модификации структуры коллагена под воздействием УФ-облучения в широком диапазоне длин волн (270-380 нм) и при разной продолжительности световой экспозиции.

**МЕТОДИКА.** Объектом исследований служили коллагеновые плёнки, полученные из препарата коллагена фирмы "Serva" (Германия). Пленку облучали ртутной лампой на воздухе при комнатной температуре, используя светофильтр УФС-5, пропускающий излучения от 270 нм до 380 нм в течение 10 и 120 часов.

В работе были использованы следующие методы исследования.

Устойчивость коллагена к действию специфической и неспецифической протеаз (бактериальной коллагеназы и пепсина) определяли по величине протеолиза при  $t=37^{\circ}\text{C}$  и  $22^{\circ}\text{C}$ , соотношение ф/с 1/10, продолжительность протеолиза 24 час. [11]. Затем в гидролизате определяли содержание оксипролина, проводя предварительно полный кислотный гидролиз (в 6 М HCl при  $t=115^{\circ}\text{C}$  24 час.) по методу Stegemann [12]. Количество оксипролина определяли по калибровочному графику, полученному со свежеприготовленным раствором коммерческого препарата оксипролина.

Величину гидролиза коллагена определяли по количеству оксипролина, перешедшего в раствор (%) под действием указанных протеолитических ферментов. За 100% принимали количество оксипролина, содержащегося в образцах коллагеновой плёнки до обработки ферментами (определяли оксипролин, проводя полный кислотный гидролиз).

Для получения щелочных гидролизатов коллагеновой плёнки 3 мг образца гидролизовали в 3 мл 1 М NaOH на водяной бане при  $t=100^{\circ}\text{C}$  в течение одной минуты. Затем часть пробы разводили и измеряли интенсивность флуоресценции, другую часть использовали для спектрофотометрической характеристики и для анализа молекулярной массы.

Спектрофотометрическую характеристику щелочных гидролизатов образцов коллагеновой плёнки проводили на спектрофотометре "Shimadzu"-400 в диапазоне длин волн от 200-500 нм.

Определение содержания карбонильных групп в исследуемых образцах проводили по реакции их с 2,4-динитрофинилгидразином (ДНФГ) [13]. Максимум спектра поглощения продуктов реакции с ДНФГ регистрируется около 360-370 нм. Для анализа использовали гомогенат образца плёнки. Гомогенизировали образец в механическом гомогенизаторе Potter's "B. Braun", измельчая 15 мг коллагена в 3 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,4).

Интенсивность флуоресценции щелочных гидролизатов коллагеновой плёнки при заданном возбуждении (ex) и эмиссии (em) ex370nm/em450nm, ex320nm/em400nm, ex350nm/em430nm, ex275nm/em310nm определяли на спектрофлуориметре "Shimadzu RF 540".

Молекулярную массу продуктов щелочного гидролиза коллагена анализировали методом гель-хроматографии на колонке 1,0×60,0 см с "Toyopearl HW-55F". На выходе с колонки собирали фракции по 3 мл, в каждой определяли оксипролин и флуоресценцию ex320nm/em400nm, ex350nm/em430nm и ex370nm/em440nm. В качестве элюирующего раствора использовали 0,1 М NaCl. Скорость элюции составляла 30 мл в час. Распределение продуктов гидролиза белка по молекулярной массе регистрировали по оптической плотности элюата, проходящего через проточную кювету спектрофотометра при 215 нм.

Колориметрические исследования цвета коллагеновой плёнки в процессе УФ-облучения приведены относительно двух стандартных колориметрических источников света: С(6500К) и А(2856К). Координаты цвета определены в базовой колориметрической системе координат МКО (Международная комиссия по освещению) – (х, у, Т%) и в более наглядной системе координат нм, р% и Т% в которой:

нм - доминирующая длина волны определяет цветовой оттенок ( $\lambda$ );

р% - чистота цвета определяет насыщенность цвета данного цветового оттенка от 0% (бесцветный) до 100% (монохроматически чистый);

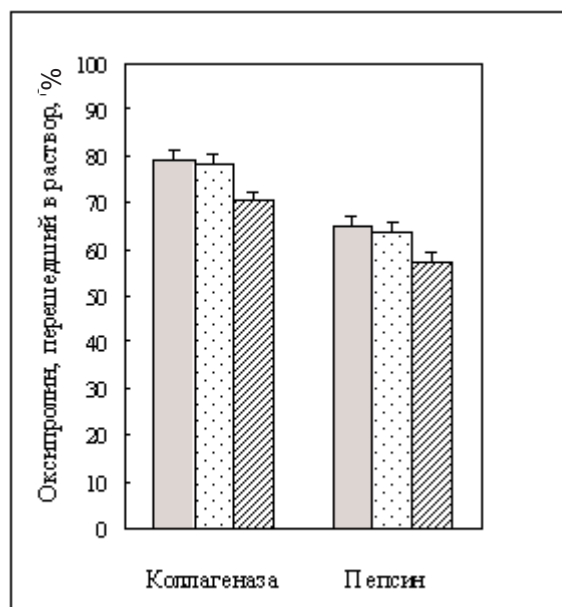
Т% - интегральный коэффициент пропускания исследуемого материала.

Рельеф поверхности коллагеновых пленок до и после УФ-облучения исследовали, используя сканирующий электронный микроскоп “Philips” SEM-515.

Во всех экспериментах анализировали по три параллельных образца. Все полученные данные обрабатывали статистически используя t-критерий распределения Стьюдента для малых выборок [14].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Характер возможных фотохимических изменений в структуре коллагеновой плёнки под воздействием УФ-облучения (270-380 нм) прежде всего оценивали по устойчивости коллагена к действию ферментных препаратов коллагеназы и пепсина. Известно, что используемая в таких экспериментах бактериальная коллагеназа (*Cl. histolyticum*) гидролизует только спирализованную часть молекулы коллагена, а пепсин действует на её концевые участки, называемые телопептидами [15].

Из представленных на рисунке 1 данных видно, что величина протеолиза коллагена коллагеназой и пепсином после УФ-облучения в течение 10 часов практически не отличается от величины указанных показателей для контрольных образцов коллагеновой плёнки. Однако, после воздействия УФ-излучения на образец в течение 120 часов отмечается четкое, статистически достоверное снижение величины протеолиза коллагена как по отношению к коллагеназе, так и пепсину.



**Рисунок 1.**

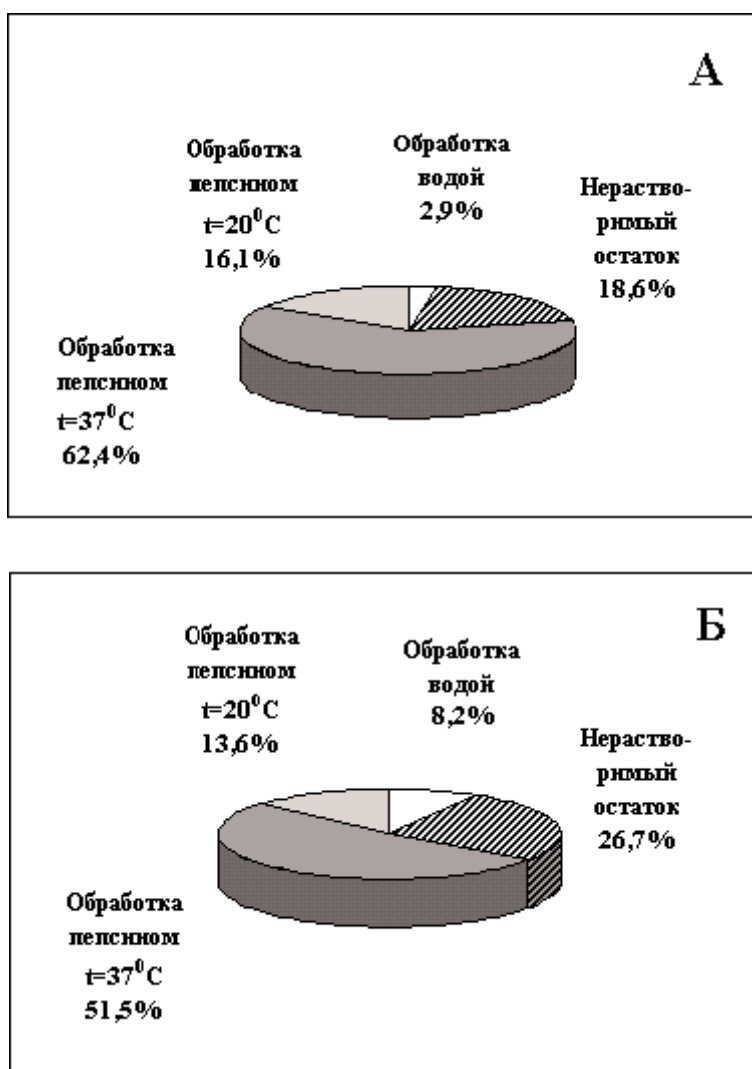
Величина протеолиза коллагена ферментными препаратами до и после УФ воздействия на плёнку.

- - контроль;
- ▤ - после УФ воздействия 10 час.;
- ▨ - после УФ воздействия 120 час.

## МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПРИ УФ-ОБЛУЧЕНИИ

Можно считать, что коллаген при длительном УФ-облучении приобретает определенную стабильность к действию протеолитических ферментов, действующих специфически на разные участки белковой молекулы, что может указывать на возможный, протекающий при длительном УФ-воздействии на коллагеновую пленку, процесс структуризации или дополнительного "сшивания" структуры коллагена.

При этом существенно изменяются и другие биохимические свойства белка, например, его растворимость. Как видно из представленных на рисунке 2 данных, после УФ-воздействия экстракция коллагена водой из облученной плёнки увеличивалась в 3-4 раза по сравнению с контрольными образцами. Вместе с тем, при последующей обработке опытного образца пепсином, анализ структурной стабильности коллагена облученной и контрольной пленок позволил выявить также и увеличение доли нерастворимой фракции коллагена после её облучения в течение 120 часов.



**Рисунок 2.**

Величина гидролиза коллагеновой плёнки при последовательной обработке водой, пепсином при  $t=20^{\circ}\text{C}$ , пепсином при  $t=37^{\circ}\text{C}$ , нерастворимый остаток.

А - контроль;

Б - коллагеновая плёнка после УФ облучения.

По-видимому, под влиянием используемого в наших экспериментальных условиях УФ-воздействия (270-390 нм) в течение 120 часов в коллагеновой пленке имеет место, с одной стороны, разрыв нековалентных связей в молекуле коллагена, но, с другой стороны, по-видимому, протекают и преобладают процессы "фотосвязывания" или стабилизации структуры коллагена за счет новых меж- и внутримолекулярных сшивок как в концевых телопептидах, так и в спирализованных участках молекулы белка.

Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися литературными данными, указывающими, что воздействие УФ-А и частично УФ-В на кожу мышей *in vivo* сопровождается образованием дополнительных поперечных сшивок в коллагеновых структурах и делает структуру коллагена кожи более устойчивой к действию пепсина [16, 17].

Проведенный спектрофотометрический анализ щелочных гидролизатов контрольной и УФ-облученной коллагеновых пленок выявил значительное увеличение (на 50%) показателей абсорбции в области 240-300 нм с максимумом при 275 нм (рис. 3). Отмечается также повышение величины поглощения в области 300-380 нм и в видимой части спектра. Указанные изменения в коротковолновой области спектра обычно связаны с конформационными изменениями, вызванными фотомодификацией в коллагене (в белках) таких ароматических аминокислот как тирозин и фенилаланин [18, 19]. Однако, нельзя исключить образование при УФ-облучении новых хромофорсодержащих соединений, поглощающих в длинноволновой области спектра (>300-400 нм).

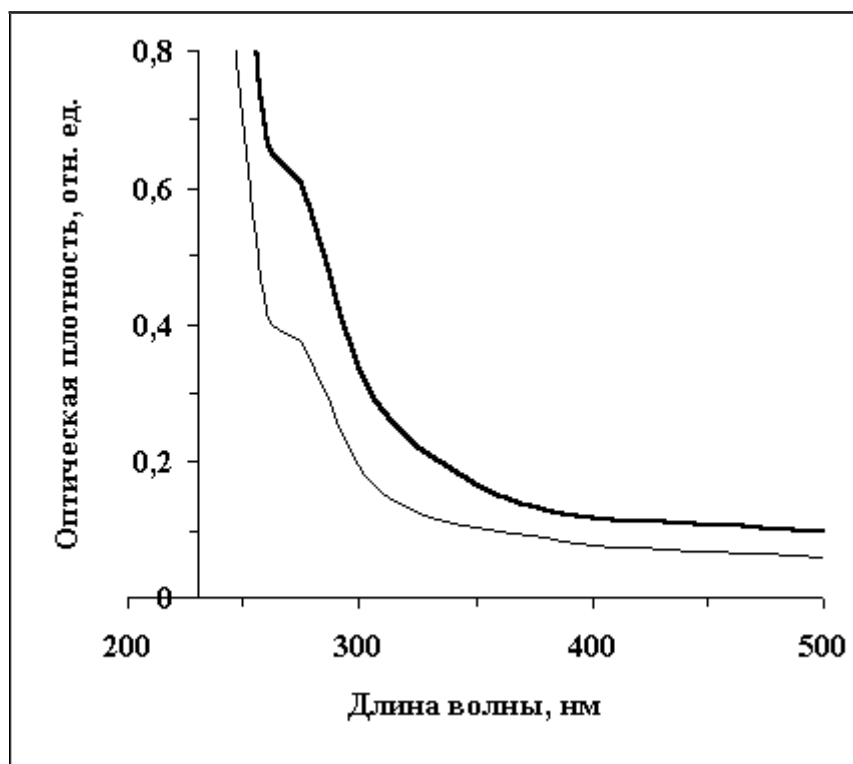


Рисунок 3.

Спектры абсорбции щелочных гидролизатов коллагеновых плёнок до (—) и после (—) УФ облучения 120 час.

## МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПРИ УФ-ОБЛУЧЕНИИ

И, действительно, изучение интенсивности флуоресценции щелочных гидролизатов коллагеновых пленок до и после УФ-воздействия показало, что в облучённом экспериментальном материале имеют место процессы фотомодификации молекул коллагена, сопровождающиеся образованием дополнительных флуоресцирующих соединений (табл. 1).

*Таблица 1.* Интенсивность флуоресценции продуктов щелочного гидролиза коллагеновых плёнок до и после УФ облучения.

<div style="text-align: center;"> <b>Длина волны</b>  <b>возб./эм, нм</b> </div>	<i>EX 370</i> <i>em 450</i>	<i>EX 350</i> <i>em 430</i>	<i>EX 320</i> <i>em 400</i>	<i>EX 275</i> <i>em 310</i>
	Интенсивность флуоресценции, усл. ед			
<b>Образец</b>				
<b>Контроль</b>	7±0,8	14±1,5	36±2,1	5±0,6
<b>10 час.</b> <b>УФ облучения</b>	8±1,2	16±1,8	38±2,6	5±0,4
<b>120 час.</b> <b>УФ облучения</b>	15±1,8	36±2,4	78±3,7	9±0,7

Как видно из данных, представленных в таблице 1, при всех исследуемых нами значениях возбуждения и эмиссии интенсивность флуоресценции щелочного гидролизата коллагена в первые 10 часов УФ-облучения коллагеновой плёнки практически не изменяется. Однако через 120 часов УФ-воздействия на пленку отмечалось значительное увеличение (в 2-2,5 раза) значений всех изученных показателей флуоресценции.

Наблюдаемое в наших опытах повышение показателей интенсивности так называемой "голубой" флуоресценции с максимумом 450 нм при возбуждении 370 нм, согласно данным литературы [20], может быть связано с изменением конформационных состояний структуры белка за счёт новых связей, образующихся в молекуле коллагена. Об этом может также свидетельствовать и повышение значений флуоресценции щелочного гидролизата при ex350nm и em430nm после 120 часов УФ-облучения.

Согласно полученным данным (табл. 1), флуоресценция коллагена с максимумом em305-310nm при возбуждении ex275nm, обусловленная фотохимическими изменениями тирозина [21], после длительного облучения также увеличивается почти в 2 раза. Это, по-видимому, связано с образованием фотопродуктов тирозина, например, дитирозина в облученном коллагене, а также с появлением при УФ-воздействии новых флуоресцирующих соединений с участием фенилаланина и других аминокислот.

Как известно, процесс фотоокисления является одним из самых распространенных механизмов фотодеградации, фотомодификации и фотостарения различных органических веществ и, в частности, белков [22].

В свою очередь, в различных биосубстратах карбонильные группы являются чувствительными к фотовоздействию хромофорами, и с их присутствием обычно связывают интенсивность окислительных реакций в белках [23].



Обнаружение в наших экспериментальных условиях существенного увеличения интенсивности флуоресценции при  $\text{ex}320\text{nm}/\text{em}400\text{ nm}$  (табл. 1) однозначно указывало на процессы фотомодификации коллагена, обусловленные реакциями фотоокисления, протекающими в коллагеновой пленке при длительном УФ-облучении.

Проведённое в наших исследованиях прямое определение количества карбонильных групп в коллагеновых пленках до и после светового воздействия хорошо подтверждает данное предположение.

Как видно из экспериментальных данных представленных в таблице 2, содержание карбонильных групп в коллагене исследуемых образцов практически не изменялось в течение 10 часов УФ-облучения. Однако через 120 часов УФ-воздействия количество карбонильных групп в белке увеличивалось почти в 10 раз по сравнению с контрольным образцом коллагеновой плёнки.

Таблица 2. Количество карбонильных групп в коллагеновых плёнках до и после УФ облучения.

Образец	нмоль/мг коллагена
Контроль	0,833
10 час. УФ облучения	0,980
120 час. УФ облучения	10,975

Все эти данные в целом свидетельствовали о том, что при длительном УФ-облучении коллагеновой плёнки в диапазоне 270-380 нм происходит процесс фотоокисления коллагена, сопровождающийся окислением аминокислотных остатков и образованием новых флуоресцирующих фотопродуктов, содержащих карбонильные группы.

Изменения в структуре коллагена под действием УФ-облучения изучали также по характеру распределения продуктов щелочного гидролиза коллагеновой плёнки по молекулярной массе с помощью метода гельхроматографии.

Из представленных на рисунке 4 данных видно, что после УФ-воздействия на образец уже через 10 часов и особенно после 120 часов экспозиции резко уменьшается количество высокомолекулярных продуктов гидролиза коллагена (в диапазоне молекулярных масс 300-50 кДа).

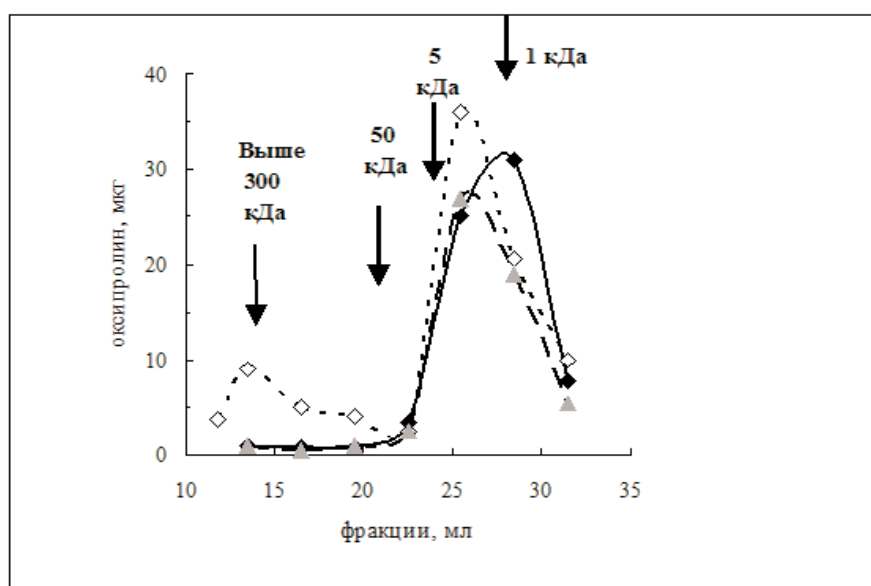


Рисунок 4.

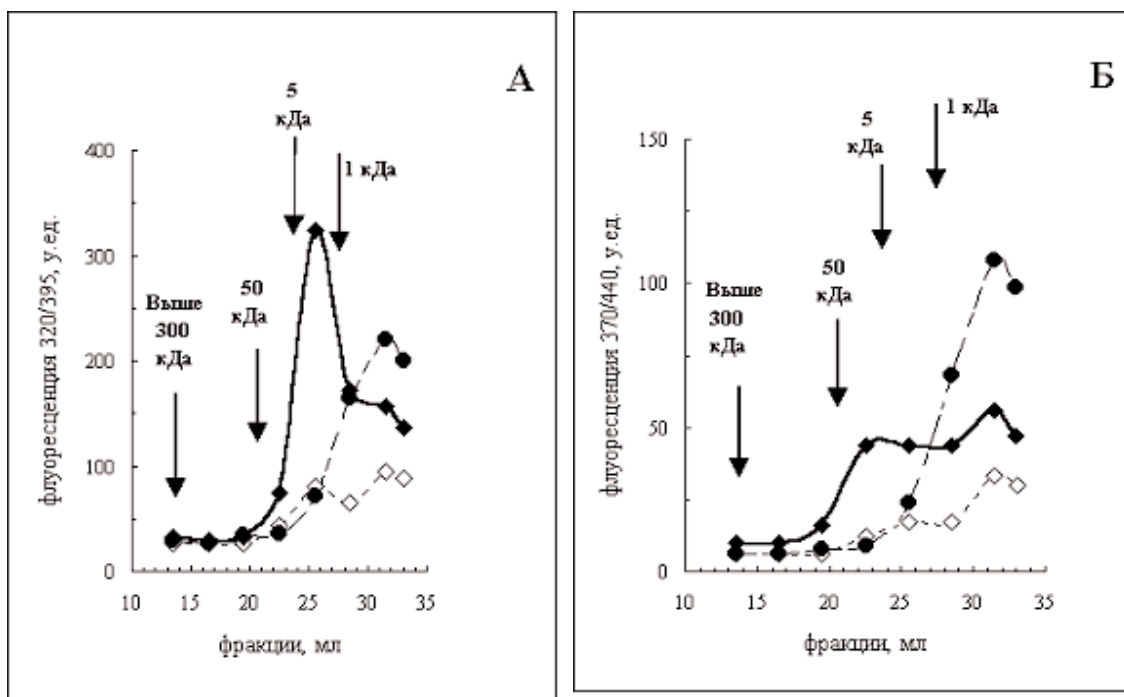
Распределение по молекулярной массе в процессе гель-хроматографии продуктов щелочного гидролиза коллагеновой плёнки до (—◇—) и после УФ облучения 10 час. (—◆—), 120 час. (—△—).

## МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПРИ УФ-ОБЛУЧЕНИИ

Следует также особо подчеркнуть, что продукты щелочного гидролиза коллагеновой плёнки, подвергнутой длительному УФ-облучению (120 час.), характеризуются фрагментами с гораздо большей молекулярной массой (в диапазоне 5-10 кДа) по сравнению с продуктами гидролиза исследуемого образца после облучения УФ-излучением в течение 10 часов (мол. масса продуктов гидролиза составила 1 кДа).

Полученные данные позволяют предположить, что на фоне общего деполимеризирующего действия кратковременного УФ-облучения на коллаген изучаемой плёнки при длительном воздействии ( $\geq 120$  час.) УФ-излучения в структуре коллагеновой молекулы могут также протекать изменения, связанные с дополнительным образованием внутри-, и межмолекулярных связей, стабилизирующих структуру исследуемого белка и способствующих образованию модифицированных коллагеновых структур с новыми спектральными характеристиками.

Проведенные спектрофлуориметрические исследования отдельных фракций щелочного гидролизата изучаемых коллагеновых пленок, выходящих с колонки с Toyopearl – HW-55, полностью подтвердили это предположение. Как видно из данных, представленных на рисунке 5, характер распределения флуоресцирующих продуктов по фракциям, содержащим белковый материал с различной молекулярной массой, существенно различается до и после УФ-облучения коллагеновых плёнок.



**Рисунок 5.**

Интенсивность флуоресценции щелочных гидролизатов коллагеновой плёнки во фракциях после гель-хроматографии до (--□--) и после УФ облучения 10 час. (--●--), 120 час. (--◆--).

А - ex320/em400; Б - ex370/em440.



Во-первых, после светового УФ-воздействия количество флуоресцирующих продуктов в коллагене возрастает как при кратковременном, так и особенно резко при длительном облучении коллагеновой плёнки (ex320nm/em400nm, ex350nm/em430nm и ex370nm/em440nm). И, во-вторых, если при кратковременном (10 час.) УФ-облучении интенсивность флуоресценции была максимальной в низкомолекулярных фракциях щелочного гидролизата коллагена (мол. масса  $\leq 1-2$  кДа), то при длительном УФ-воздействии (120 час.) наибольшие значения показателей флуоресценции отмечались в более высокомолекулярных продуктах гидролизата (фракции с мол. массой 5-10 кДа).

Всё вышеизложенное указывало, что в наших экспериментальных условиях в процессе воздействия УФ-света на коллагеновую пленку отмечается зависимое от времени образование и накопление помимо дополнительных сшивок в структуре коллагена также и новых хромофорсодержащих соединений или компонентов, которые могут существенно изменить спектральные характеристики исследуемой плёнки.

И, действительно, в отдельной серии экспериментов, мы изучали и обнаружили изменение координат цвета коллагеновой плёнки после облучения её УФ-излучением (270-380 нм) в течение 120 часов (табл. 3).

Таблица 3. Средние значения координат цвета коллагеновой плёнки в процессе УФ облучения.

Образец	Источник света	Координаты цвета				
		x	y	T(%)	L(nm)	p(%)
Контроль	C(6500K)	0,314	0,320	83,3	«C»	«C»
Опыт	C(6500K)	0,318	0,324	78,0	599,3	1,5
Контроль	A(2856K)	0,451	0,409	83,6	586,4	3,3
Опыт	A(2856K)	0,454	0,410	78,5	586,2	6,5

В таблице 3 представлены значения координат цвета контрольного образца коллагеновой плёнки и образца плёнки облучённой в течение 120 часов УФ-излучением в спектральном диапазоне 270-380 нм.

Анализ данных таблицы показал, что облучённые образцы коллагеновой плёнки (в отличие от контрольных) приобрели желтоватую окраску и стали менее прозрачными.

Так, если цвет контрольного образца при освещении источником (C 6500K) совпадает с цветностью самого источника ("C"), то у опытного образца появляется едва заметный желтоватый оттенок ( $\lambda$  - 599,3 нм, P - 1,5%). Снижение коэффициента пропускания (T) с 83,3% до 78,0% и незначительное пожелтение опытного образца плёнки может свидетельствовать как об образовании дополнительных хромофор, так и о помутнении самой плёнки.

## МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА ПРИ УФ-ОБЛУЧЕНИИ

Кроме того, было обнаружено изменение и других характеристик коллагеновой плёнки после УФ-облучения. Так, нами с помощью сканирующего электронного микроскопа проведено микроскопическое исследование рельефа пленок до и после УФ-воздействия в течение 120 часов (рис. 6). Было установлено изменение поверхности пленок в результате облучения, которое сопровождалось появлением многочисленных трещин. Возможно, это связано с потерей воды в коллагене и пленке в процессе облучения, а также с вероятной фотодеструкцией коллагена и/или другими фотохимическими процессами.

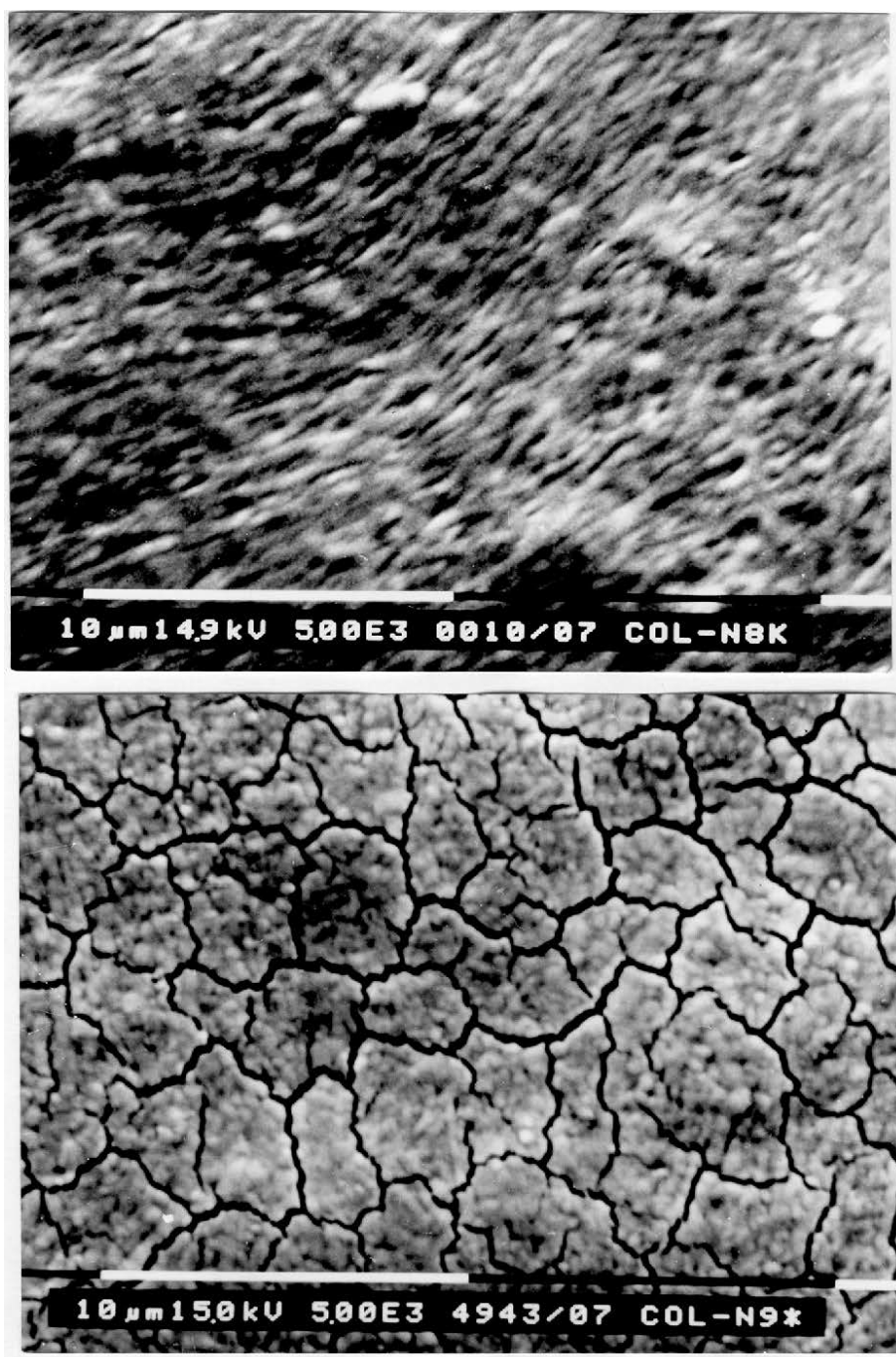


Рисунок 6.  
Поверхность плёнок до (А) и после УФ-облучения 120 час. (Б). СЭМ×5000.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, проведенное нами комплексное биохимическое, колориметрическое и микроскопическое исследование коллагеновой плёнки до и после УФ-облучения дает возможность говорить о разнонаправленности суммарного действия УФ, т.е. о наличии таких фотохимических процессов как фотодеградация, фотоконформация, фотоокисление и одновременно об образовании новых хромофорсодержащих соединений и формированием новых дополнительных поперечных связей в коллагеновой молекуле, а также зависимости направленности и интенсивности всех фотохимических реакций от продолжительности УФ-воздействия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. (1974) в кн.: Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых волокон. Из-во "Медицина". Москва с. 123.
2. Bateman J.F., Lamande S.R., Ranshaw J.A. (1996) in: Extracellular matrix (Comper W.D. ed.) Amsterdam: Harwood, pp. 22-67.
3. Слуцкий Л.И. (1969) в: Биохимия нормальной и патологически изменённой соединительной ткани. Из-во Медицина. Ленинградское отделение с. 52.
4. Fisher G.J., Kang S., Varani J. (2002) Arch. Dermatol, **138**, 1462-1470.
5. Trautinger F., Mazzucco K., Knobler R.M., Trenz A. (1994) Arch. Dermatol. Res., **286**, 490-494.
6. Naderi L. (2001) J. Photochem. Photobiol. B: Biology, **63**, 41-51.
7. Kligman L.H., Akin F.J., Kligman A.M. (1982) J. Invest. Dermatol, **78**, 181-189.
8. Kligman L.H., Akin F.J., Kligman A.M. (1985) J. Invest. Dermatol., **84**, 272-276.
9. Fujimori F. (1985) Eur. J. Biochem., **152**, 299-306.
10. Maeda K., Naganuma M., Funuda M. (1991) Photochem. Photobiol., **54**, 737-740.
11. Реброва Г.А., Денисов-Никольский Ю.И., Ромаков Ю.А. (1984) Вопр. мед. химии, №6, 102-106.
12. Stegemann H., Staider K. (1967) Clin. Chim. Acta, **18**, 267-273.
13. Cao G., Cutler R.G. (1992) Arch. Biochem. Biophys. Spectrom, **34**, 537-543.
14. Лакин Г.Ф. (1980) Биометрия. Изд-во "Высшая школа", М., с. 96-110.
15. Реброва Г.А., Бержицкая В.В., Василевский В.К., Ребров Л.Б., Быков В.А. (2004) Клин. геронтол., **10**, 20-26.
16. Kligman L.H., Gebre M. (1991) Photochem. Photobiol., **54**, 233-237.
17. Rittie L., Fisher G.J. (2002) Ageing Res. Rev., **1**, 705-720.
18. Sionkowska A., Wisniewski M., Skopinska J. (2004) J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, **162**, 545-554.
19. Kato J., Uchida K., Kawakishi S. (1994) Photochem. Photobiol., **50**, 343-349.
20. Со Сан Хо, Реброва Г.А., Василевский В.К., Быков А.А., Ребров Л.Б. (2001) Клин. геронтол., №3-4 с. 35-40.
21. Kato Y., Nishikawa T., Kawakishi S. (1995) Photochem. Photobiol., **61**, 367-372.
22. Kato Y., Uchida K., Kawakishi S. (1992) J. Agric. Food Chem., **40**, 373-379.
23. Mukhopadhyay C.K., Chatterjee I.B. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 30200-30205.

Поступила: 01. 06. 2006.

**BIOCHEMICAL AND PHOTOMETRIC STUDIES OF MODIFICATION  
OF COLLAGEN STRUCTURE UNDER UV RADIATION**

***G.A. Rebrova, V.K. Vasilevsky, L.B. Rebrov, L.A. Osipova, V.A. Bykov***

Scientific Research and Education Centre of Biomedical Technology, Krasina ul., 2, Moscow,  
123056 Russia; tel.: (495) 254-11-93; e-mail: galinarebrova@mtu-net.ru; nicbmtvilar@mtu-net.ru

The influence of UV irradiation (270-380 nm) on the biochemical, fluorescence and colorimetric properties of collagen was studied. The long-term UV irradiation (120 h) was accompanied by the increase of structural stability of collagen to specific and nonspecific proteolytic enzymes, by formation of new additional fluorophore-containing molecules, by the increase in quantity of carbonyl groups in the collagen and by strong changing of the distribution pattern of alkaline hydrolysis products during gel-chromatography. The coordinates of colour of the collagen films are also changed. These changes of collagen suggest that UV irradiation induces photomodification and photooxidation processes in collagen.

**Key words:** collagen, UV radiation, photochemistry, photoaging.