

BIOMECHANICAL CHANGES IN COLLAGEN FIBRILS DUE TO RIBOSE-INDUCED GLYCATION

Kateryna Topchylo¹, Halina Tkaczenko²

**VI науково-практична конференція студентів та
молодих вчених з міжнародною участю
«ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ
ПАТОФІЗІОЛОГІЇ ДО ДОСЯГНЕНЬ
СУЧАСНОЇ МЕДИЦИНИ І ФАРМАЦІЇ»**

16 травня 2024 рік



МЕТА

Взаємодія між цукровим діабетом та структурною цілісністю колагену має значні наслідки для функціональності тканин і прогресування захворювання. Метою цього дослідження було **емпіричне вивчення впливу глікації, індукованої рибозою, на біомеханічні властивості колагенових фібрил з використанням атомно-силової мікроскопії для точних вимірювань.**

МЕТОДОЛОГІЯ

Ми використали колагенові фібрили, взяті зі звичайних сухожиль згинача пальців (CDE) та поверхневого згинача пальців (SDF) дорослої моделі великої рогатої худоби, щоб імітувати процеси глікації, які відбуваються при діабетичній патології.

Зразки піддавали контрольованій глікації шляхом інкубації з рибозою протягом 24 годин та 14 днів порівняно з контролем, обробленим фосфатно-солевим буфером (ФСБ). Для всіх зображень атомно-силової мікроскопії в цьому дослідженні використовувався атомно-силовий мікроскоп Bioscope Catalyst (Bruker, США).



ВСТУП

ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ - це багатогранне захворювання, що характеризується високим рівнем глюкози в крові, спричиненим дефектами вироблення інсуліну, його дії або обома цими факторами. Він став глобальною кризою в галузі охорони здоров'я з широким спектром ускладнень, які знижують якість життя та підвищують ризик смертності.

Ключовим аспектом цих ускладнень є неензиматична глікація білків - процес, який прискорюється в умовах гіперглікемії, що часто зустрічається при діабеті (Khalid et al., 2022).

ВСТУП

КОЛАГЕН - ключовий компонент позаклітинного матриксу, є невід'ємною складовою структурної основи тканин всього організму, забезпечуючи механічну стабільність та еластичність. Загалом, волокнисті полімери є основними будівельними блоками всіх типів опорних тканин, від одноклітинних організмів у воді до рослин і тварин (Kannus, 2000).

Колаген з тваринних джерел широко використовується як біоматеріал для каркасів, що застосовуються при регенерації кісток. (Parenteau-Bareil, 2010). Він також використовується у виробництві гемостатів (речовин, що сприяють згортанню крові), бинтів і пластирів для відновлення сухожилів.

Взаємодія між діабетом і структурною цілісністю колагену має значні наслідки для функції тканин і прогресування захворювання (Kanazawa I., 2017).

Глікація колагенових волокон

ГЛІКАЦІЯ - це звичайна неферментативна реакція між білками та цукрами, яка призводить до утворення кінцевих продуктів глікування в організмі людини (AGEs).

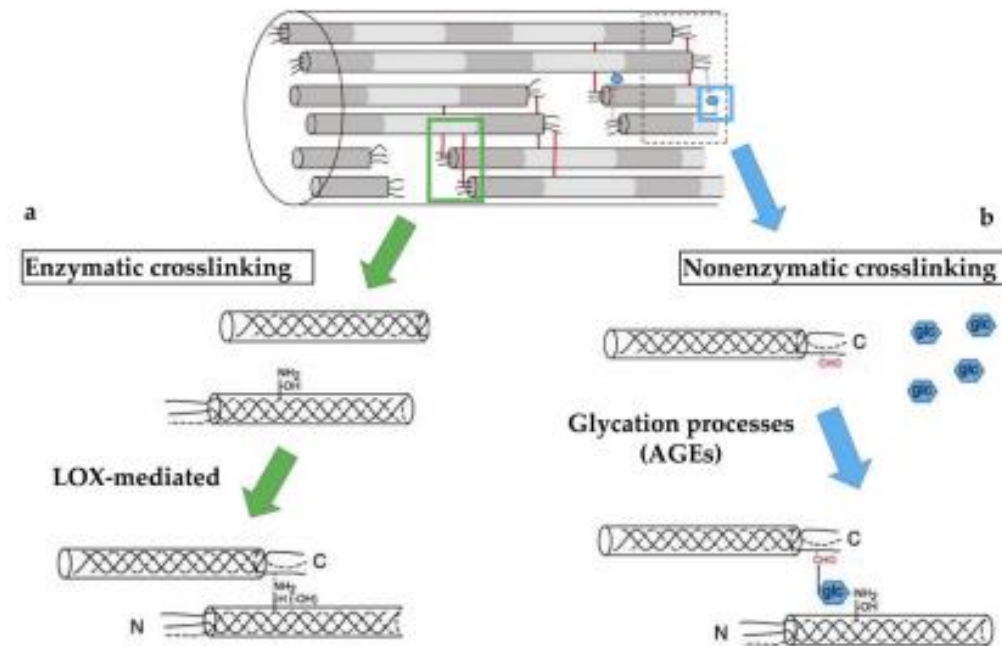


Рис. (а) Ферментативний кросинговер та (b) неферментативний кросинговер в колагенових волокнах.

Реакція глікації починається з утворення оборотної **ОСНОВИ ШИФФА** між вуглеводом - зазвичай глюкозою - і аміногрупою білка (наприклад, бічним ланцюгом лізину в колагені).

Непостійна основа Шиффа перетворюється на **ПРОДУКТ АМАДОРІ**.

Потім, через складну серію безперервних реакцій, утворюються різні побічні продукти гліколізу, включаючи гліюксаль, метилгліюксаль (МГО) і 3-дезоксиглюкозон, які можуть взаємодіяти з позаклітинними білками, що призводить до утворення AGEs. (Grandhee, 1991)

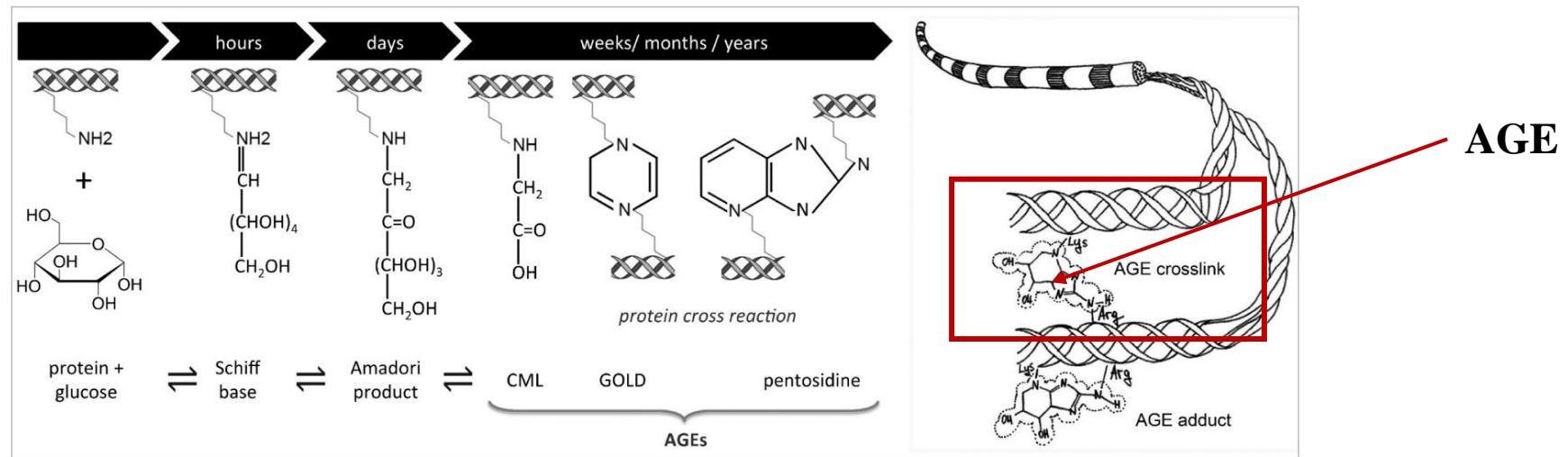


Рис. (Зліва) Схема послідовності метаболічних хімічних реакцій, що лежать в основі утворення AGE (наприклад, пентозидин) [51] та (праворуч), як такі продукти можуть утворювати адукти та/або кросинговери на структурах колагену

КІНЦЕВІ ПРОДУКТИ ГЛІКАЦІЇ

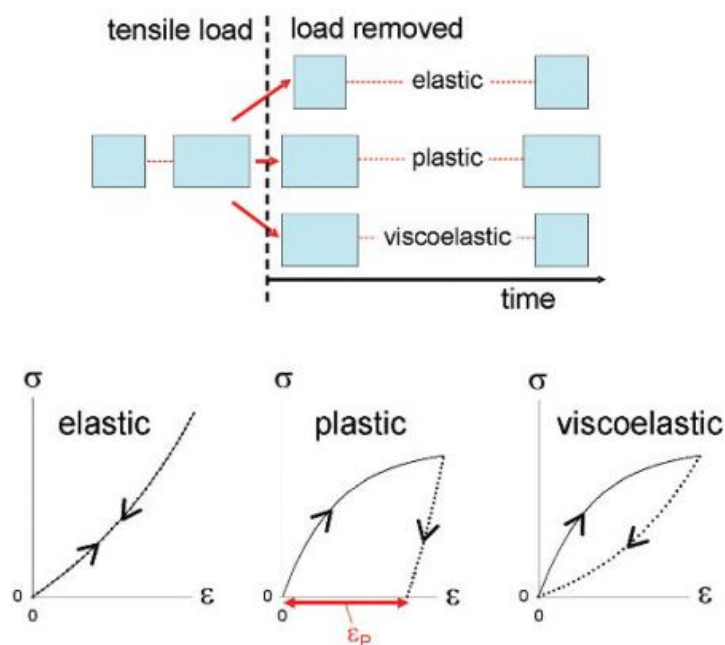
AGEs мають сильний вплив на структурну та функціональну цілісність білків, що призводить до зміни механіки тканин і робить значний внесок у патогенез діабетичних ускладнень, таких як нефропатія, ретинопатія та погіршення загоєння ран (Singh et al., 2014).

Травми та розриви сухожиль у людей з діабетом можуть бути пов'язані зі змінами в структурі колагену, спричиненими гіперглікемією, оскільки надлишок глюкози в крові реагує з колагеном, утворюючи AGEs, що робить сухожилля жорсткішими та більш вразливими до травм (Nichols et al., 2020).

Діабет також пов'язаний з підвищеною крихкістю скелета і більшою ймовірністю переломів (Kanazawa, 2017).

(!) Глікація білків, у тому числі колагену, відіграє значну роль у патогенезі діабету, призводячи до пошкодження тканин і органів (Tell-Lebanon O., Rotman-Pikielny P., 2016).

Взаємодія між діабетом і структурною цілісністю колагену має значні наслідки для функціонування тканин і прогресування захворювання. Глікування передбачає приєднання молекул цукру до білків, особливо до колагену, який є найпоширенішим білком в організмі людини, що призводить до утворення просунутих кінцевих продуктів глікування (AGEs) (Twarda-Clapa et al., 2002).



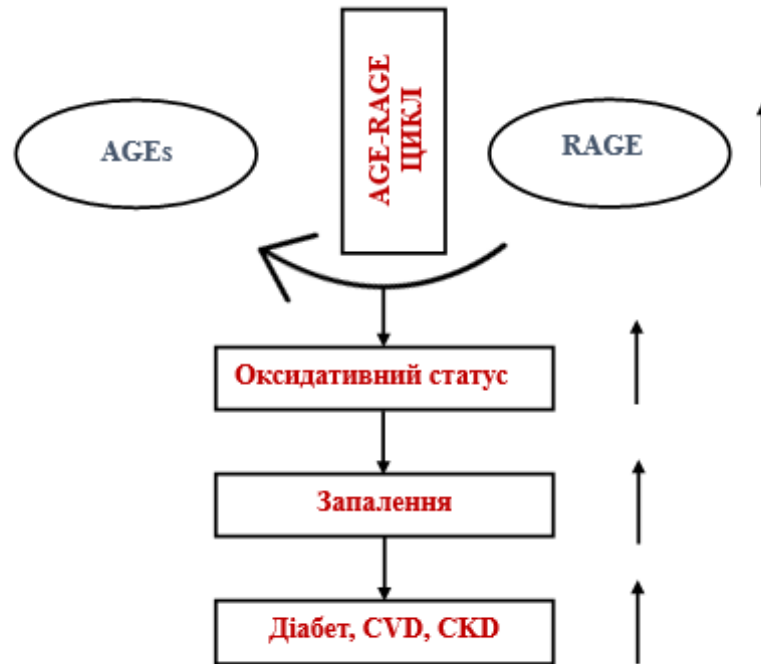


Рис. Схематичне зображення ролі AGEs та RAGE-рецепторів у патогенезі діабету, серцево-судинних захворювань (CVD) та хронічної хвороби нирок (CKD)

Матеріали та методи

Ex vivo підготовка зразків колагену CDE та SDF до дослідження

- У рамках дослідження біомеханічних властивостей колагенових волокон ми зосередилися на ретельній підготовці зразків сухожиль. Для дослідження були обрані **парні зразки сухожиль загального розгинача пальців (CDE) та поверхневого згинача пальців (SDF)**, які були отримані із задніх кінцівок 1-2-річної великої рогатої худоби, отриманих з місцевої скотобійні.
- Після вилучення сухожиль вони негайно були очищені від усіх прилеглих тканин. Потім розрізані на стандартні відрізки довжиною 1 см для забезпечення однорідності зразків і полегшення порівняльного аналізу.

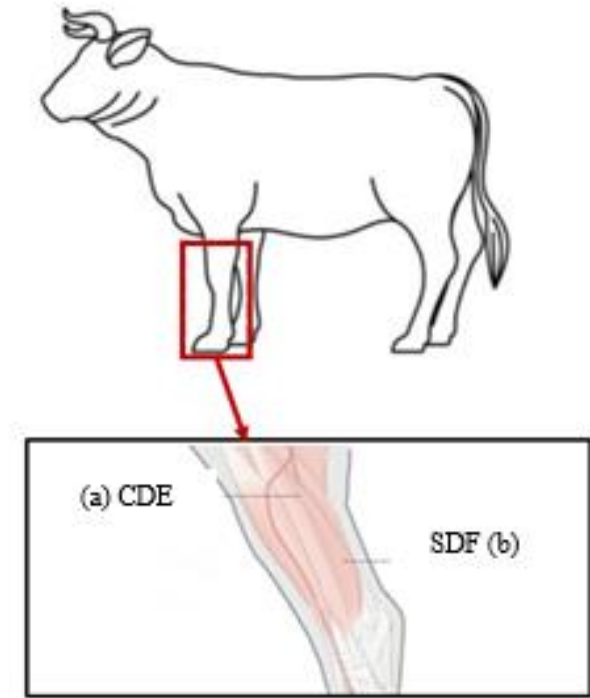
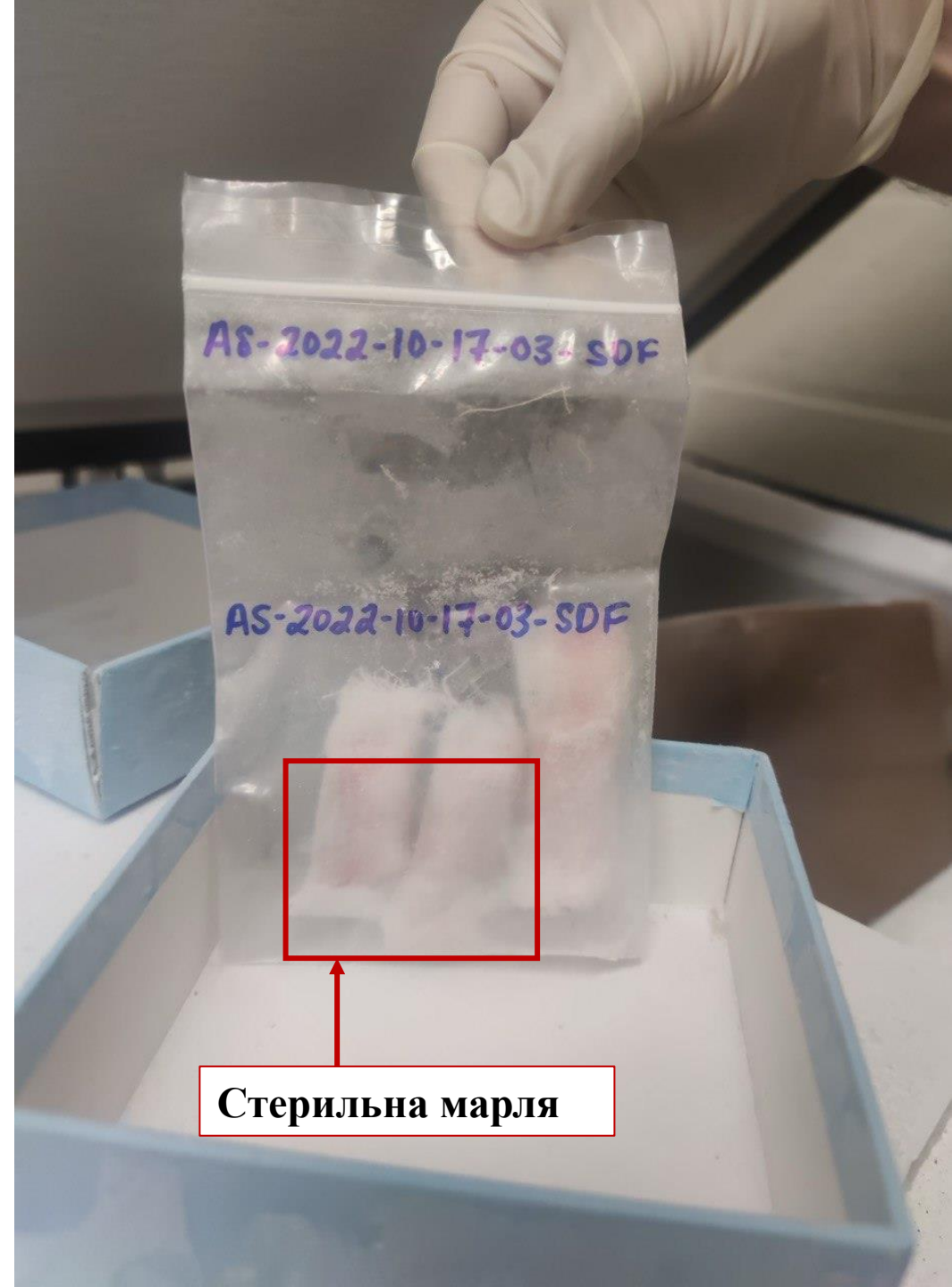


Рис. (а) Загальний розгинач пальців (CDE), (b) поверхневий згинач пальців (SDF).

- Щоб запобігти деградації колагенових волокон, зрізи сухожиль швидко загортали **в стерильну марлю, змочену кріозахисним розчином**, щоб зберегти їхні структурні та механічні характеристики. Потім цей препарат швидко заморожували за допомогою рідкого азоту для подальшого пригнічення ферментативних і неферментативних процесів деградації.
- Ці зразки зберігалися в сухому вигляді **при температурі -80°C** , що ефективно зберігає біологічну активність і підтримує біохімічну стабільність тканини протягом тривалого періоду часу.



Матеріали та методи

In vivo підготовка зразків колагену CDE та SDF до дослідження

1. Фрагмент сухожилля поміщали в чашку Петрі з 500 мкл розчину PBS.
2. За допомогою леза та пінцета колагенові фібрили витягували з сухожилля в PBS.
3. Після видалення сухожилля багатий на колаген розчин поміщали в чашку Петрі зі скляним дном на 30 хвилин при кімнатній температурі, щоб фібрили прилипли до дна чашки.
4. Потім розчин зливали, чашку ретельно промивали надчистою водою і висушували газоподібним азотом.
5. Цей процес повторювали для двох зразків CDE і SDF, кожену серію інкубували з 0,3М рибозою протягом 24 годин і двох тижнів відповідно.

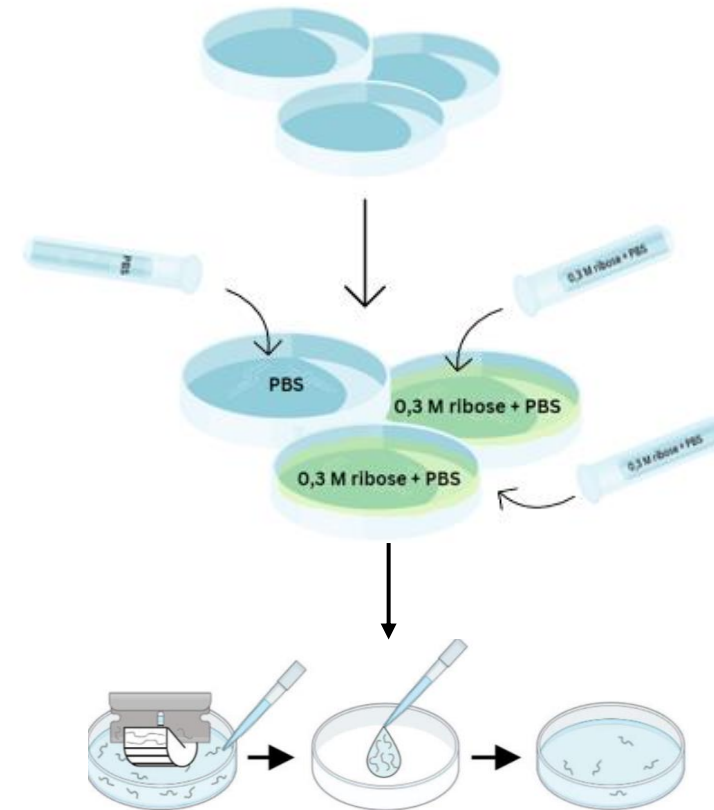


Рис. Підготування зразків до інкубування *in vivo*

Рис. *In vivo*
підготовка
зразків колагену
CDE та SDF до
дослідження



КОНТРОЛЬНА ГРУПА

Контрольна група в цьому дослідженні відігравала ключову роль у створенні основної лінії для оцінки механічних властивостей колагену за відсутності індукованої рибозою глікації. Контрольні зразки обробляли розчином ФСБ замість рибози, виконуючи кілька ключових функцій в експериментальному дизайні..

Таким чином, контрольна група стала ключовим стандартом порівняння, за допомогою якого ми вимірювали вплив глікації, індукованої рибозою, на механіку колагенових фібрил. Це порівняння мало вирішальне значення для підтвердження гіпотези про те, що лікування рибозою змінює модуль фібрил колагену, що є центральним висновком дослідження, який сприяє нашому розумінню патофізіологічних механізмів при діабеті.

АТОМНО-СИЛОВА МІКРОСКОПІЯ

Атомно-силова мікроскопія (АСМ) - метод, який використовується для створення зображень, що дозволяють досліджувати поверхневі структури з нанометровою точністю. Він використовує зонд з гострим наконечником, який рухається по зразку у вигляді сітки. Коли наконечник торкається поверхні, він злегка згинається. (Рис)

Цей вигин виявляється системою, що поєднує лазер і фотодіод, яка вимірює зміни вихідної напруги з фотоприймача. Рух зонда спрямовується п'єзoeлектричним сканером, який точно регулює положення наконечника. (Mazumder, 2019)

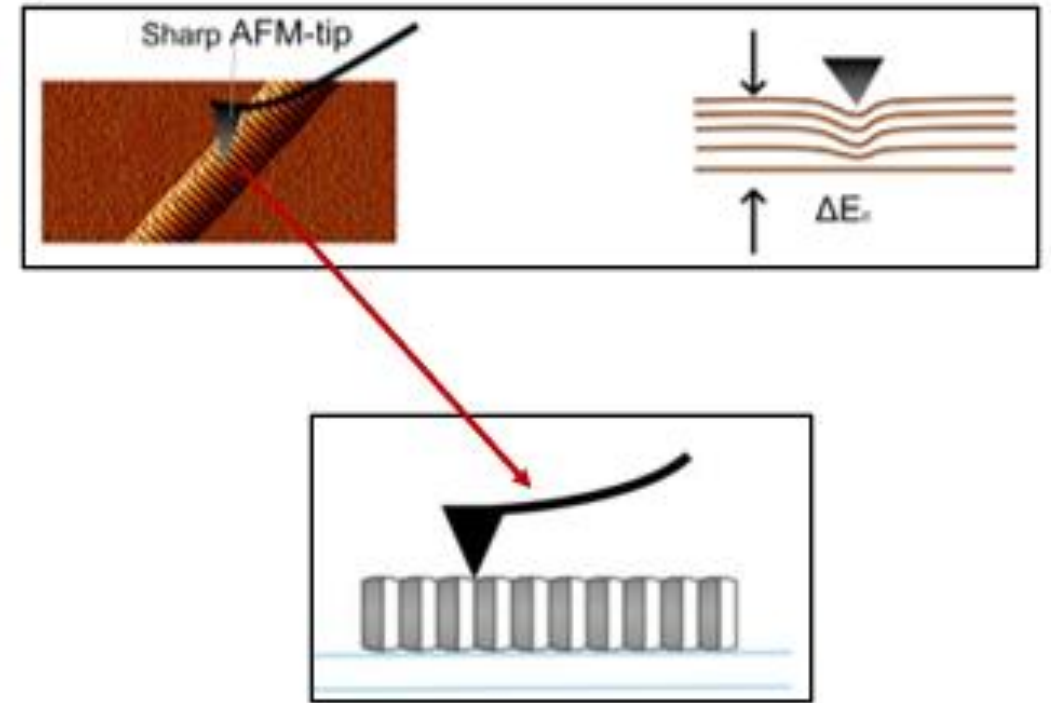


Рис. Відгук гнучких фібрил і скафолду, виміряний за допомогою АСМ методом індентування. Взаємодія (а) наконечника зонда АСМ нанометрового розміру. Наконечник нанометрового розміру використовується для прикладання стискаючої сили до поверхні контакту. E_c позначає композитний модуль стиснення, що діє на одне волокно.

У цьому дослідженні для всіх АСМ-зображень використовували мікроскоп Bioscope Catalyst. Принцип дії полягає у скануванні поверхні тонким щупом, розташованим на кінці консольної балки, яку називають кантилевером.

Усі АСМ-кантилевери, використані в дослідженні, були типу ScanAsyst-Fluid з постійною пружністю 0,7 Н/м, резонансною частотою приблизно 150 кГц і радіусом наконечника 600 нм.

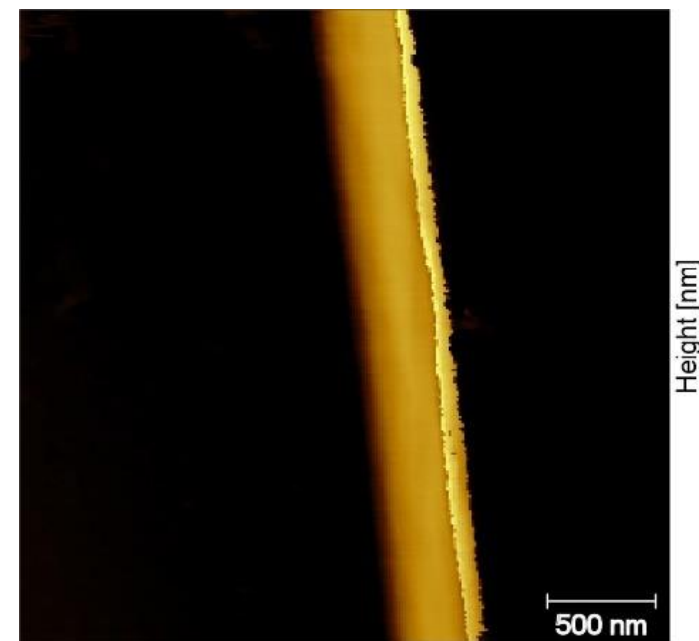
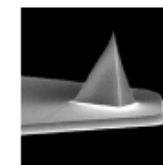


Рис. Зразок сухожилля CDE, що інкубувався в розчині рибози протягом 2 тижнів.

SCANASYST-FLUID

Frequency
Nom: 150KHz

Spring Const.
Nom: 0.7N/m



РЕЗУЛЬТАТИ ПРОВЕДЕНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

CDE

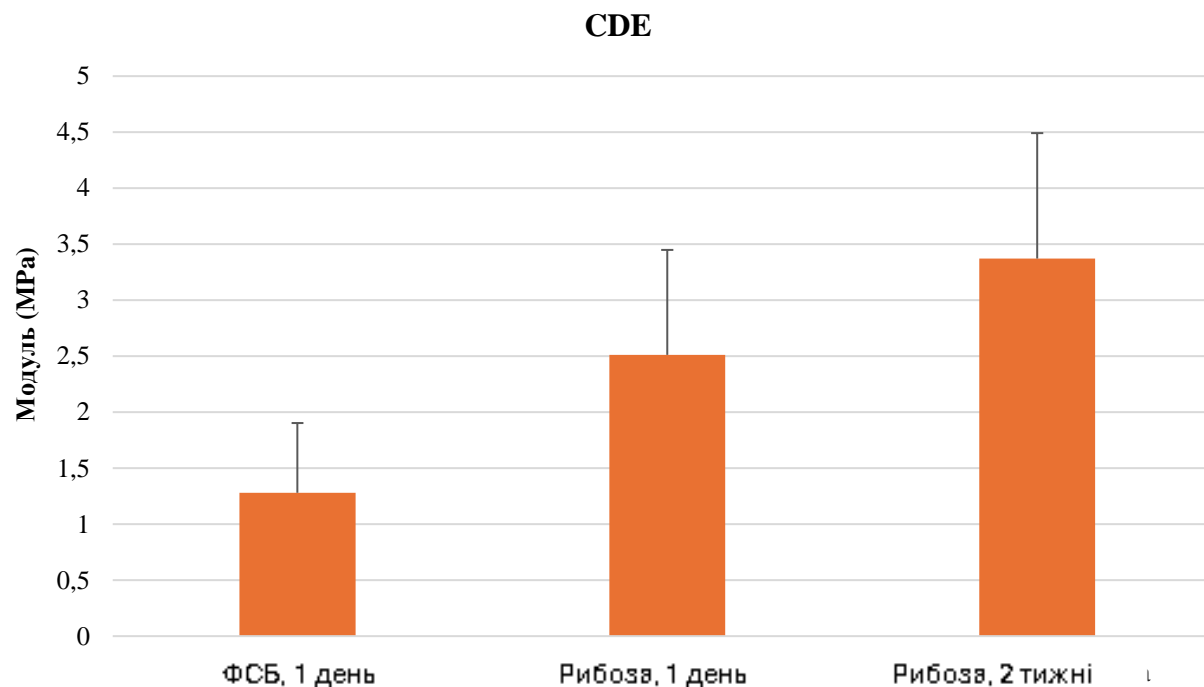
Для волокон CDE спостерігалось значне збільшення модуля пружності після глікації. Значення модуля збільшилося з 1,28 МПа в контрольному ФСБ до 2,51 МПа після 24 годин впливу рибози, що означає приблизне збільшення жорсткості на 95,5%. Цей ефект посилення жорсткості став більш вираженим після 2 тижнів обробки рибозою, коли модуль пружності збільшився до 3,37 МПа, що на 163% більше порівняно з початковими контрольними вимірюваннями

CDE	Тип лікування	Час інкубації	Модуль (МПа)	SD (МПа)
	ФСБ	24 години	1.28	0.622
	Рибоза	24 години	2.51	0.938
	Рибоза	2 тижні	3.37	1.12

РЕЗУЛЬТАТИ ПРОВЕДЕНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

CDE

Після впливу рибози ми спостерігали значне збільшення модуля пружності як для CDE, так і для SDF фібрил порівняно з 24-годинним контролем у ФСБ. Для фібрил CDE (n=5 у кожному стані) модуль пружності збільшився на 95,5% через 24 години і на 163% через 2 тижні.



РЕЗУЛЬТАТИ ПРОВЕДЕНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

SDF

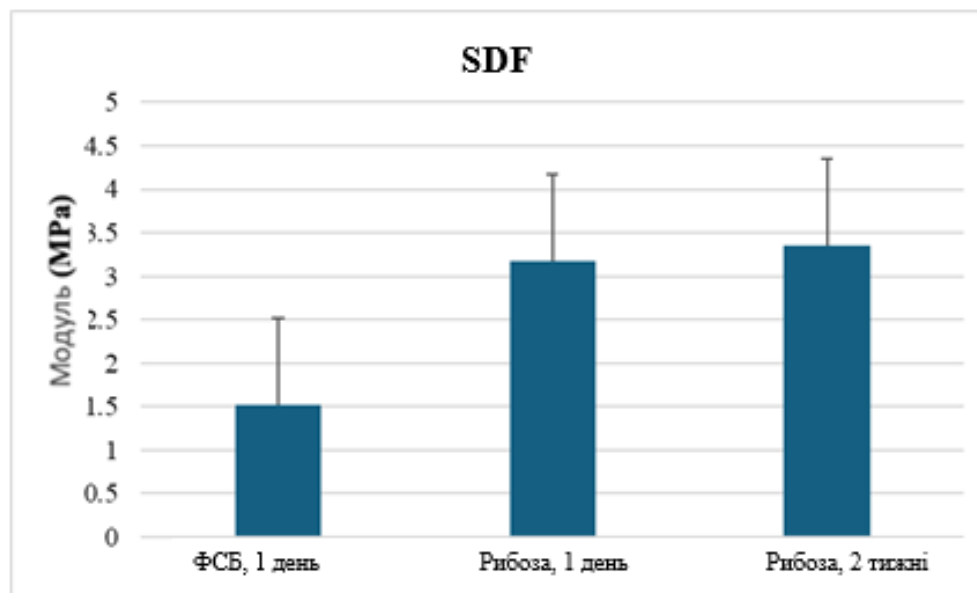
Колагенові волокна SDF показали значне збільшення модуля пружності після обробки рибозою, що відображає збільшення жорсткості, яке перевершило показники волокон CDE. З початкового модуля пружності 1,52 МПа в контролі ФСБ, волокна SDF досягли 3,17 МПа через 24 години після впливу рибози - збільшення на 108,5%. Протягом більш тривалого 2-тижневого періоду модуль міцності дещо збільшився до 3,35 МПа, що на 120% більше порівняно з контрольними волокнами.

SDF	Тип зразка	Час інкубації	Модуль (МПа)	SD (МПа)
	ФСБ	24 години	1.52	1.51
	Рибоза	24 години	3.17	0.995
	Рибоза	2 тижні	3.35	0.398

РЕЗУЛЬТАТИ ПРОВЕДЕНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

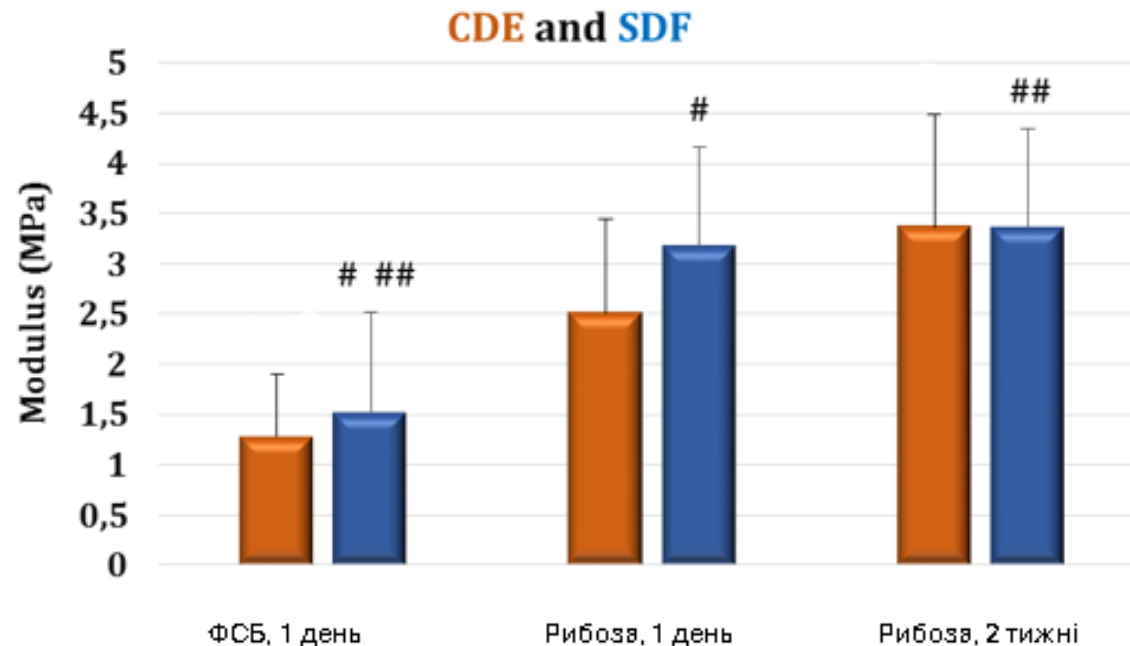
SDF

Часовий характер цих змін виявив швидку початкову реакцію на індуковану рибозою глікацію в перші 24 години з подальшим поступовим збільшенням жорсткості протягом наступних днів. Волокна SDF показали швидше зростання модуля Юнга після початкової 24-годинної експозиції з рибозою порівняно з волокнами CDE, що може бути пов'язано з висотою волокон. Ця різниця свідчить про те, що анатомічна будова волокон може впливати на швидкість, з якою глікування змінює механічні властивості колагену.



Порівняння змін модуля пружності у зразках CDE та SDF

Після впливу рибози ми спостерігали значне збільшення модуля пружності як для CDE, так і для SDF фібрил порівняно з контролем ФСБ через 24 години. Для фібрил CDE (n=5 для кожного випадку) модуль пружності збільшився на 95,5% через 24 години і на 163% через 2 тижні. Для фібрил SDF (n=4 для кожного стану) модуль пружності збільшився на 108,5% через 24 години і на 120% через 2 тижні.



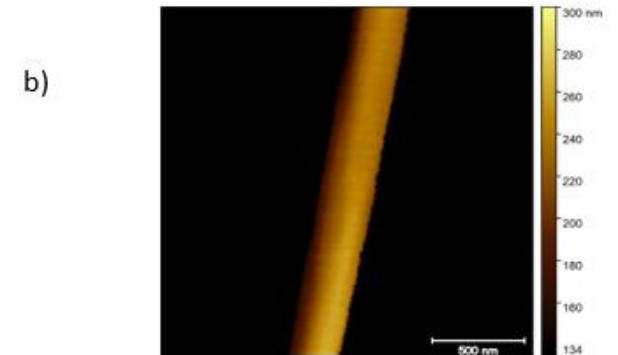
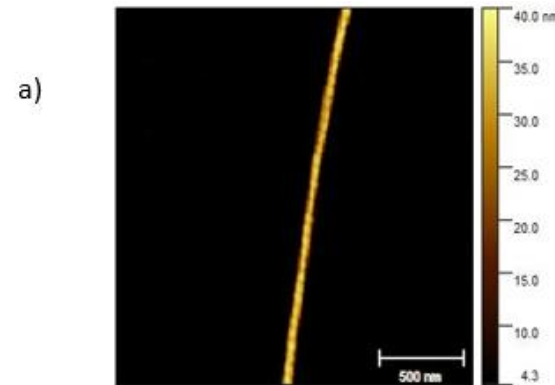
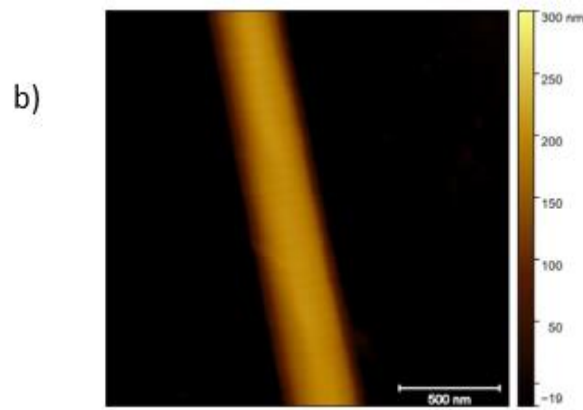
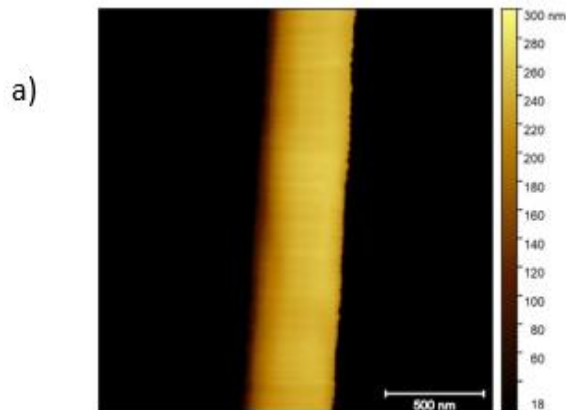
Порівняння змін модуля пружності у зразках **CDE** та **SDF**

Аналіз модуля пружності колагенових фібрил після інкубації в розчині рибози виявляє достовірне збільшення жорсткості після одностороннього періоду, що важливо з точки зору біохімічних процесів глікації. Статистично значущі відмінності в модулях пружності для зразків, інкубованих протягом 1 доби, порівняно з контрольними зразками, підтверджують гіпотезу про ранній вплив глікації на колагенові волокна в середовищі з високим вмістом рибози. Відсутність подальших статистично значущих змін модулів пружності між зразками, інкубованими протягом 24 годин і 2 тижнів, може свідчити про насичений стан процесу глікації, коли подальші модифікації колагенових волокон вже не впливають суттєво на їхні механічні властивості.

Ці результати можуть відігравати ключову роль у розумінні патофізіологічних процесів, пов'язаних з діабетом, і, можливо, у розробці терапевтичних стратегій, спрямованих на зменшення негативних наслідків глікації в сухожильних тканинах.

Кореляція між висотою колагенових волкон та механічних змінах, індукованих глікацією

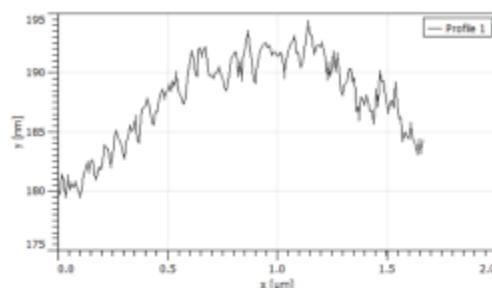
Зразок	Діаметр	
	Середнє значення [nm]	Середньоквадратичне відхилення (Rms) [nm]
CDE	187,8	3,731
	202,3	2,389
SDF	25,00	2,053
	242,2	3,601



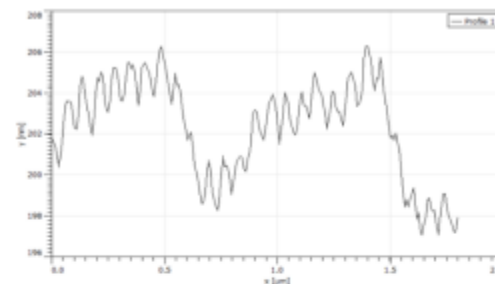
Зразок сухожилля CDE, інкубованого в розчині рибози протягом 2 тижнів. Різні волокна (a) і (b).

Зразок сухожилля SDF, інкубованого в розчині рибози протягом 2 тижнів. Різні волокна (a) і (b).

Спостерігалася різниця у впливі рибози на жорсткість залежно від діаметра фібрил. Більш тонкі фібрили SDF демонструють швидке підвищення жорсткості, яке не збільшується суттєво через 24 години, що, ймовірно, пов'язано з більш швидким насиченням ефектів глікації або швидшою реакцією через меншу кількість матеріалу для проникнення. На противагу цьому, товстіші фібрили CDE демонструють більш поступове і безперервне збільшення жорсткості, що свідчить про повільнішу глікацію.



Графік 4. Зображення профілю зразка сухожилля CDE, отриманого в програмному забезпеченні Gwyddion, показує топографію колагенових фібрил, інкубованих протягом 2 тижнів. Середня висота або середній діаметр становить 187,8 нм, що вказує на середню товщину фібрил. Середньоквадратичне значення (Rms) 3,731 нм вимірює текстуру або шорсткість поверхні фібрил - це відносно низьке значення, що свідчить про те, що поверхня фібрил є досить гладкою.



Графік 5. Зображення профілю волокна CDE, отриманого в програмному забезпеченні Gwyddion, із середнім значенням діаметра - 202,3 нм і Rms 2,389.

Статичний аналіз

Для оцінки значущості спостережуваних змін у модулі пружності між досліджуваною та контрольною групами ми використали односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA).

Цей тест призначений для порівняння середніх значень трьох або більше незалежних груп, щоб визначити, чи статистично відрізняється середнє значення хоча б однієї групи від інших. У контексті нашого дослідження односторонній ANOVA був особливо корисним для визначення того, чи є відмінності в жорсткості між колагеновими фібрилами, обробленими рибозою, і контрольними зразками результатом обробки глікування, а не випадковими.

ANOVA проводили окремо для CDE і SDF фібрил у кожній часовій точці, щоб порівняти контрольні зразки, які піддавалися впливу буфера ФСБ, зі зразками, обробленими рибозою, протягом 24 годин і протягом тривалого періоду в 2 тижні. F-статистику, отриману за допомогою ANOVA-аналізу, використовували для визначення того, чи існувала статистично значуща різниця в модулі пружності між групами.

Статистичний аналіз

Дуже низькі p -значення демонструють високий ступінь достовірності спостережуваного збільшення модуля пружності колагенових фібрил після впливу рибози, підтверджуючи, що зміни не були результатом випадкової варіації у зразках.

Ці статистичні результати підтверджують гіпотезу про те, що індуковане рибозою глікування має вимірний вплив на механічні властивості колагенових фібрил, і підтверджують експериментальний підхід, використаний у цьому дослідженні. Забезпечуючи надійну статистичну базу, аналіз не тільки посилює висновки цього дослідження, але й створює основу для подальших досліджень впливу глікації на колаген у ширшому контексті тканинної патології, пов'язаної з діабетом.

ВИСНОВКИ

Різна реакція на глікацію, спостережена між фібрилами CDE та SDF, пропонує подальше дослідження ролі анатомічних та структурних факторів у сприйнятливості до глікації. Визначення тканин з вищим ризиком пошкодження, викликаного глікацією, може призвести до розробки цільових стратегій запобігання ускладненням діабету.

Крім того, потенціал фармакологічного втручання для інгібування процесів глікації або підвищення деградації кінцевих продуктів глікації (AGE) пропонує перспективний шлях для профілактики прогресування ускладнень, пов'язаних з діабетом.

Це дослідження висвітлює можливості, що відкриваються завдяки змінам у колагені, викликаним рибозою, які можуть служити моделлю для вивчення тканинних змін у випадку діабету. Також пропонується підхід, який може допомогти у розробці методів лікування для зменшення ускладнень, пов'язаних із колагеном у діабетиків.

The image is a high-magnification micrograph of a material surface, likely a polymer or biological material, showing a complex, wavy, and textured pattern. A white grid is overlaid on the image, with a square box highlighting a specific region. A vertical white line runs through the center of the image. In the bottom right corner, there is a scale bar labeled "100 nm".

ДЯКУЮ ЗА УВАГУ!

100 nm