

Przyczyny powstawania chorób krążka międzykręgowego, zwanego potocznie dyskiem, w aspekcie zaburzeń budowy i funkcji kolagenu ludzkiego

Causes of formation of the intervertebral disc diseases, colloquially termed as slipped disk, in the aspects of disorders of structure and function of human collagen

dr n. med. Sławomir Skrzyński¹, dr hab. A. Sionkowska², mgr A. Marciniak²

1. Klinika Neurochirurgii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie
2. Wydział Chemii, Pracownia Biopolimerów Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Dla oszacowania wpływu choroby krążka międzykręgowego na przejście kolagenu z helisy w spiralę (coil) i na morfologię kolagenu w tkankach pobranych od pacjentów podczas operacji neurochirurgicznej stosowano różnicową kalorymetrię skaningową (ang. DSC). Pobrano 40 krążków międzykręgowych od pacjentów ze zwyrodnieniową chorobą krążka międzykręgowego, poddanych operacji z powodu bólu w dolnej części pleców. Pacjenci byli w wieku od 20 do 70 lat. Podczas badań DSC materiał utrzymywano w stanie wilgotnym. Dane pozwalają na porównanie stabilności termicznej tkanki kolagenowej od zdrowych pacjentów i pacjentów cierpiących na chorobę krążka międzykręgowego. W pracy omówiono porównanie pomiędzy przejściem z helisy w spiralę pod wpływem ciepła w przypadku włókien kolagenowych od pacjentów z chorobą krążka międzykręgowego i włókien kolagenowych od zdrowych osób. Szybkość ogrzewania ma wpływ na położenie kolagenu w tkankach krążka przy temperaturach powodujących degenerację. Wyższa temperatura przejścia helisy w spiralę w przypadku kolagenu w krążkach zwyrodniałych sugeruje, że dochodzi do dodatkowego tworzenia połączeń krzyżowych pomiędzy włóknami kolagenowymi. Temperatury denaturacji kolagenu w zwyrodniałych krążkach u mężczyzn mają niższe wartości niż w przypadku krążków u kobiet. Choroba krążka międzykręgowego wywołuje zmiany w budowie kolagenu i prowadzi do tworzenia dodatkowych połączeń krzyżowych pomiędzy włóknami kolagenu.

Abstract: Differential scanning calorimetry (DSC) has been used to estimate the effect of disc disease on the collagen helix-coil transition and morphology for tissue extracted from patients during surgical operation. Forty discs were obtained from patients with degenerative disc disease undergoing surgery for low back pain. The patients were in the age between 20 and 70 years old. The specimens were kept wet during DSC experiment. The data allow the comparison between thermal stability of collagen tissue from healthy patients and from patients suffering from disc disease. In the paper the comparison between thermal helix-coil-transition for collagen fibers from patients suffering from disc disease and collagen fibers from healthy organisms has been discussed. The heating rate has an influence on the position on denaturation temperatures of collagen in disc tissues. Higher helix-coil transition temperature of collagen in degenerated disc suggests that additional intermolecular cross-linking of collagen fibers occurs. Denaturation temperatures of collagen in degenerated male disc possess smaller values than for female ones. Disc disease induces changes in collagen structure and leads to formation of additional crosslinks between collagen fibers.

Słowa kluczowe: kolagen, choroba krążka międzykręgowego, widma elektroniczne

Key words: collagen, disc disease, differential scanning calorimetry

Wprowadzenie

Kolagen jest głównym białkiem tkanki łącznej. Jest on bardzo wytrzymały na rozciąganie i stanowi główny składnik więzadeł oraz ścięgien. Kolagen odpowiada za elastyczność skóry, a jego degradacja prowadzi do powstawania zmarszczek towarzyszących procesowi starzenia się. Ponadto kolagen wypełnia rogowkę, gdzie jest obecny w formie krystalicznej. Natywna cząsteczka tropokolagenu (masa cząsteczkowa 300 kDa) zawiera trzy łańcuchy polipeptydowe, z których każdy składa się z 1000 reszt aminokwasowych, oplecionych wokół siebie na kształt potrójnej helisy. Atomy w poszczególnych łańcuchach łączą się ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi, trzy łańcuchy zaś łączą się ze sobą słabszymi wiązaniami, tworząc strukturę potrójnej helisy. Kiedy dochodzi do denaturacji cieplnej białka, słabsze wiązania ulegają rozpadowi, natomiast wiązania kowalencyjne pozostają nienaruszone, a trzy łańcuchy oddzielają się od siebie i tworzą przypadkowe sploty [1–3]. W warunkach *in vivo* włókna kolagenu muszą być dostatecznie stabilne, aby wytrzymywały niszczące działanie czynników cieplnych, a jednocześnie zdolne do łączenia oraz odłączania tworzących je cząstek. W roztworze zakres temperatur, w którym dochodzi do rozwijania się szeregu postaci fibrylarnych kolagenu, różni się zaledwie o kilka stopni od temperatury organizmu, ale kiedy cząsteczki łączą się, tworząc postacie fibrylarne, dochodzi do zwiększenia

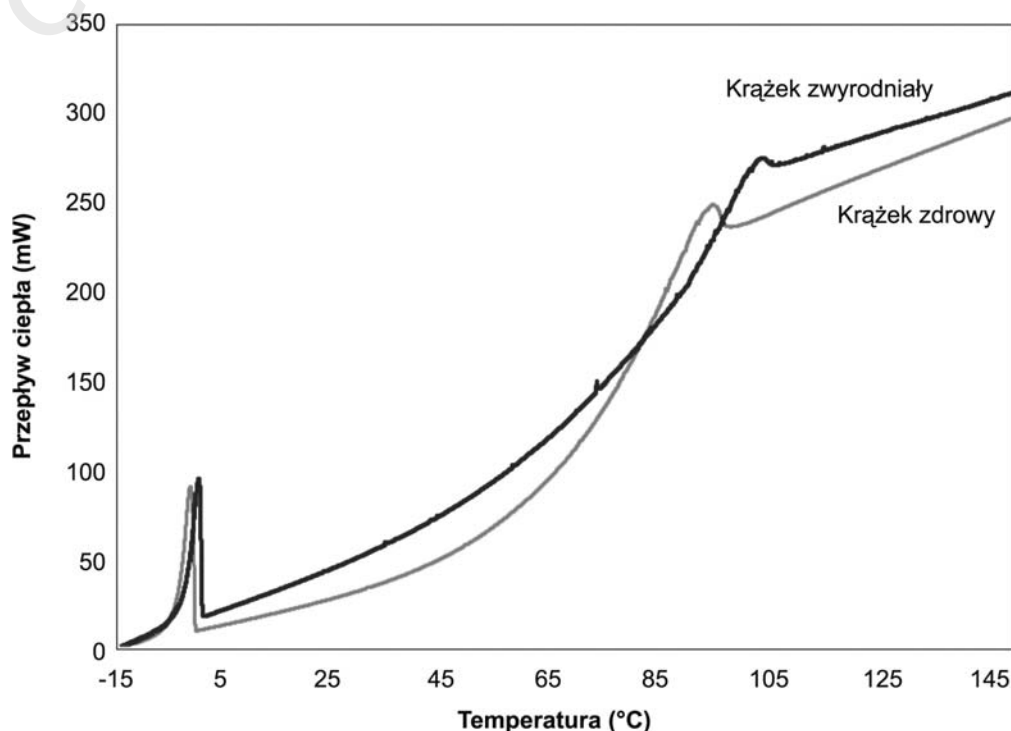
temperatury przemiany do $\sim 27^{\circ}\text{C}$ [4, 5]. Stabilność potrójnej helisy kolagenu zależy od obecności wiązań wodorowych. Denaturacja cieplna kolagenu zależy od zawartości wody, pH podłoża oraz stopnia wytworzenia wiązań krzyżowych [6–10].

W prezentowanej publikacji opisano doświadczenie, w którym oceniano metodą kalorymetryczną wpływ choroby krążków międzykręgowych na przekształcanie się kolagenu z postaci helisy do postaci splotów dla próbek tkanek pobranych od pacjentów podczas zabiegów chirurgicznych. Choroba krążka międzykręgowego jest jednym z najczęstszych zaburzeń układu mięśniowo-szkieletowego. Zakres badań nad wpływem choroby krążka międzykręgowego na właściwości cząstek kolagenu jest raczej ograniczony. Jednakże zwyrodnieniowa choroba krążka międzykręgowego oraz skolioza wpływają na funkcje mechaniczne tkanki łącznej [11].

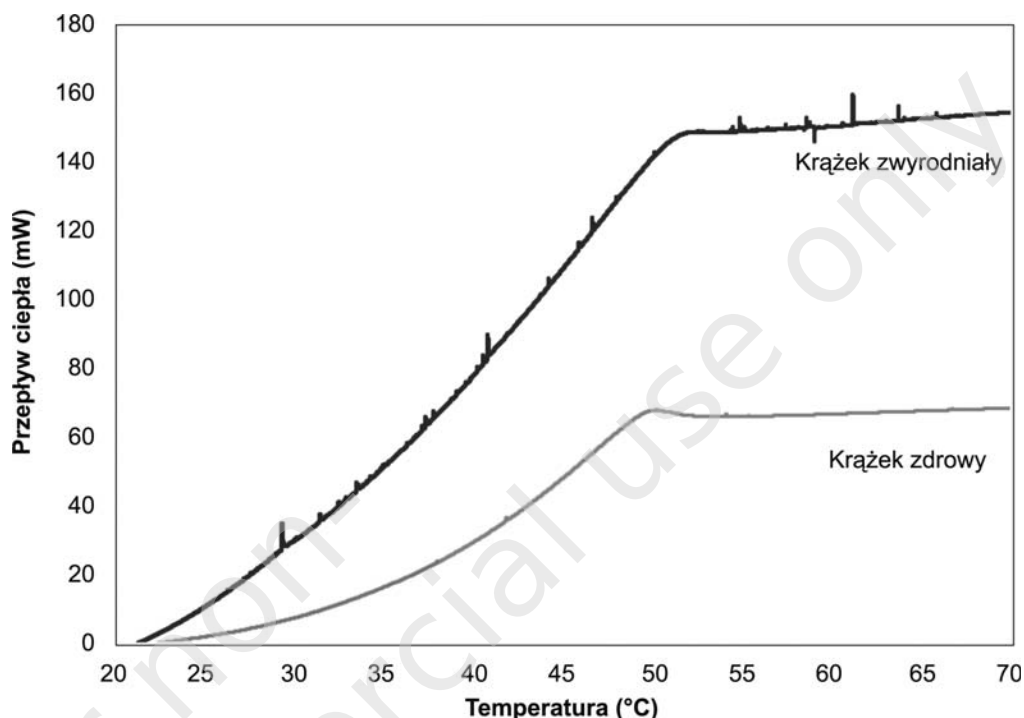
Materiał oraz metody

Trzydzieści krążków międzykręgowych uzyskano od pacjentów ze zwyrodnieniową chorobą krążka międzykręgowego w trakcie zabiegu operacyjnego z powodu dolegliwości bólowych w dolnej części kręgosłupa. Wiek pacjentów mieścił się w przedziale od 20 do 70 lat. Probki były przechowywane w roztworze podczas trwania badania DSC. Do oceny kalorymetrycznej użyto skanowania tkanek przy użyciu kontrolowa-

Rycina 1. Wartość DSC dla próbek zdrowych oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych ogrzewanych z prędkością 5°C na minutę.



Rycina 2. Wartość DSC dla próbek zdrowych oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych ogrzewanych z prędkością 0,5°C na minutę.



nego komputerowo kalorymetru Perkin-Elmer DSC-7 z dołączoną sprężarką Intracooler oraz oprogramowania dostarczonego przez producenta (wersja 1991). Zważone próbki ($\pm 0,01$ mg) podgrzewano z prędkością 5°C na minutę od temperatury 20°C do odpowiedniej temperatury, używając pustej szalki jako układu odniesienia. Ponadto próbki pochodzące z czterech krążków zbadano podczas podgrzewania z prędkością 0,5°C na minutę w zakresie temperatur od 20 do 100°C.

Dane umożliwiają porównanie stabilności termicznej próbek kolagenu pochodzących od zdrowych ochotników oraz od pacjentów z chorobą krążka międzykręgowego.

Wyniki oraz omówienie

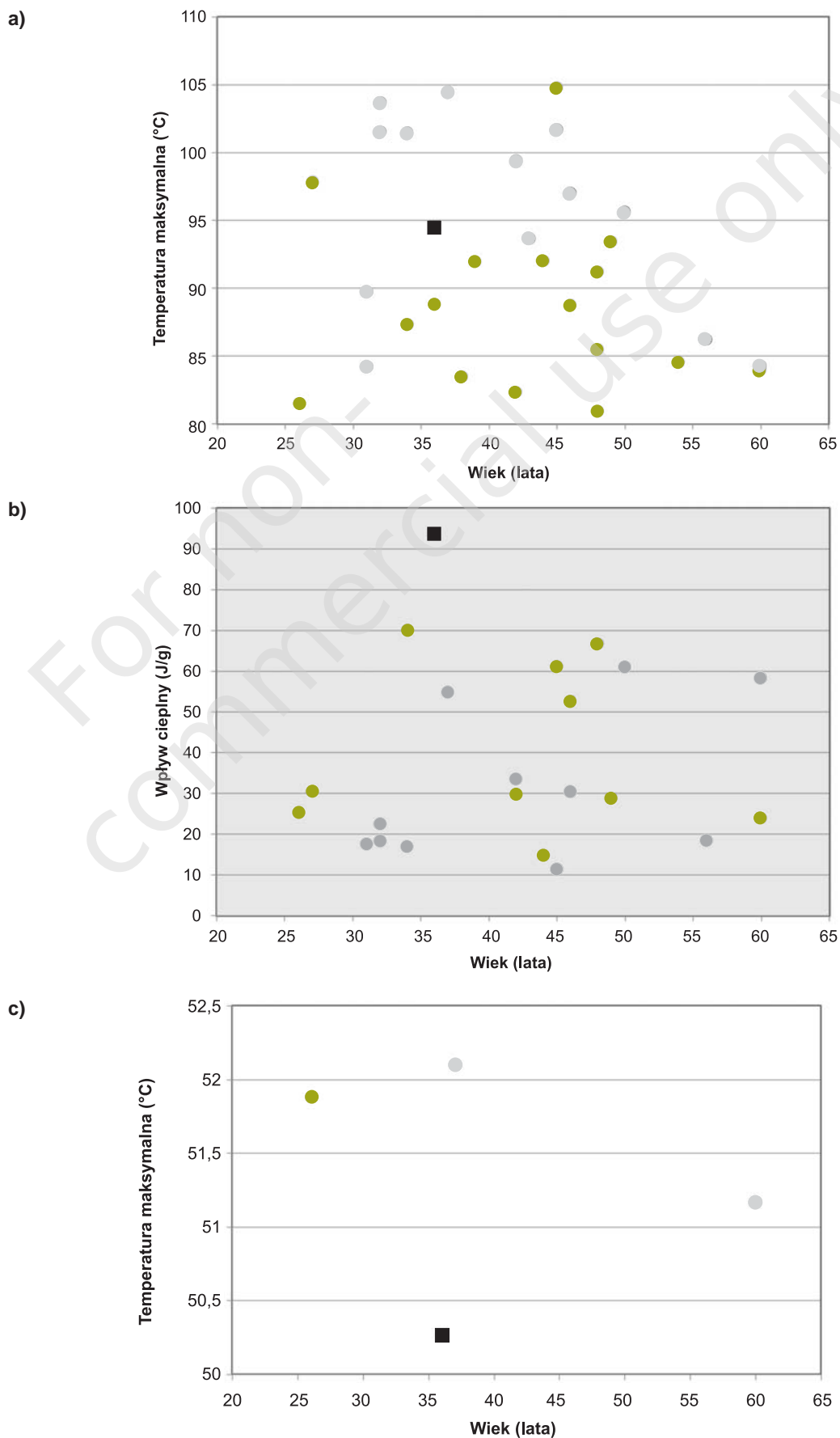
Krzywe DSC dla kolagenu znajdującego się w zdrowych krążkach międzykręgowych oraz w krążkach międzykręgowych dotkniętych procesem zwy-

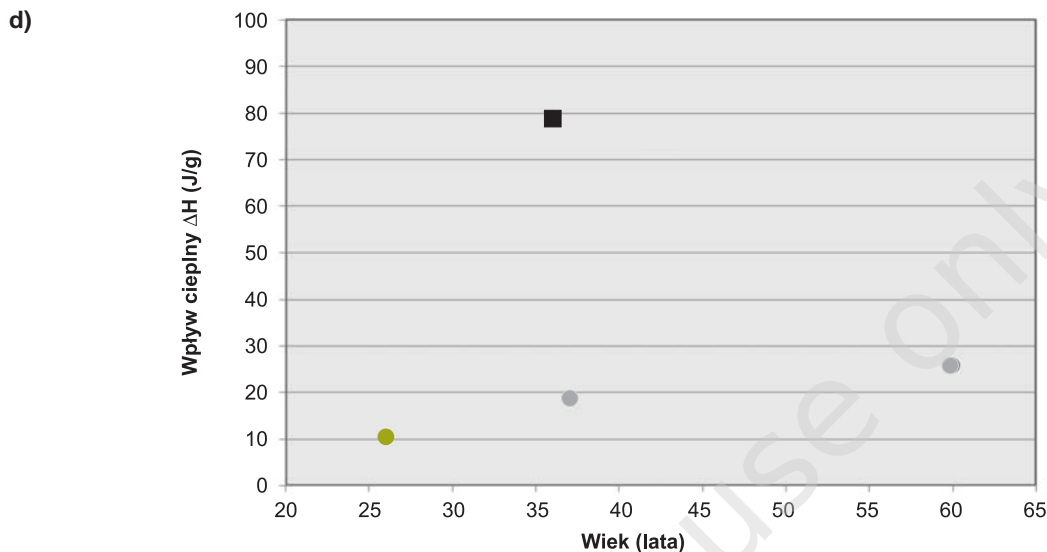
rodnieniowym przedstawiono na rycinie 1 oraz rycinie 2. Krzywe na rycinie 1 uzyskano podczas ogrzewania z prędkością 5°C/min. Krzywe na rycinie 2 uzyskano podczas ogrzewania z prędkością 0,5°C/min. Jak widać, szybkość ogrzewania ma wpływ na wartość temperatury denaturacji kolagenu w tkankach krążków międzykręgowych. Przekształcanie się kolagenu z postaci helis do postaci splotów dla zdrowych krążków międzykręgowych następuje w temperaturze około 94,5°C (gdy krzywe DSC były rejestrowane podczas ogrzewania z prędkością 5°C/min) oraz w temperaturze około 50°C (gdy krzywe DSC były rejestrowane podczas ogrzewania z prędkością 0,5°C/min). Dla kolagenu pochodzącego ze zdegenerowanych krążków międzykręgowych wartość maksymalna DSC występuje w przedziale 84–104°C (gdy krzywe DSC były rejestrowane podczas ogrzewania z prędkością 5°C/min) oraz w przedziale 51–52°C (gdy krzywe DSC

Tabela 1. Dane kalorymetryczne dla kolagenu w ludzkich krążkach międzykręgowych ogrzewanego z prędkością 0,5°C na minutę.

	Wiek pacjenta	Płeć	Temperatura maksymalna T_p , °C	Wpływ cieplny na denaturację kolagenu ΔH , J/g
Zwyrodniałe krążki międzykręgowo	26	M	51,88	10,6
	37	F	52,10	18,8
	60	F	51,17	25,8
Zdrowe krążki międzykręgowo	36	F	50,27	78,8

Rycina 3. Temperatury przemiany (a, c) oraz entalpia przemiany (b, d) dla zdrowych (■) oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych (● kobiety, ● mężczyźni).





były rejestrowane podczas ogrzewania z prędkością $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Dane te przedstawiono w tabeli 1.

Profile DSC pokazują, że choroba krążka międzykręgowego indukowała zmiany w strukturze molekularnej kolagenu w tkance krążków międzykręgowych, które zmieniały położenie wartości maksymalnej DSC dla kolagenu (wysoce energetyczna oraz ostra endotermia, która jest charakterystyczna dla potrójnej helisy). Wyższa wartość temperatury przemiany postaci helikalnej kolagenu w postaci splotów w zwyrodniałych krążkach międzykręgowych sugeruje, że obecne są dodatkowe wewnątrzcząsteczkowe wiązania krzyżowe pomiędzy włóknami kolagenu. Ponieważ zdrowy krążek pochodził z organizmu kobiety, porównaliśmy krzywe DSC dla zdrowych oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych jedynie dla krążka międzykręgowego pochodzącego od kobiety (nie dysponowaliśmy krążkiem międzykręgowym pochodzącym od mężczyzny). Jednakże porównaliśmy krzywe DSC dla zwyrodniałych krążków międzykręgowych pochodzących od kobiet oraz od mężczyzn. Obserwowaliśmy, że wartość maksymalna odpowiedzialna za denaturację cieplną kolagenu w krążkach międzykręgowych pochodzących od mężczyzn znajduje się w zakresie $80,95\text{--}97,87^{\circ}\text{C}$, podczas gdy dla kobiet wartość ta znajduje się w przedziale $86,25\text{--}104,47^{\circ}\text{C}$ (ryc. 3). Może to sugerować, że kolagen w krążkach międzykręgowych pochodzących od kobiet zawiera większą liczbę wiązań krzyżowych w porównaniu z kolagenem w krążkach międzykręgowych pochodzących od mężczyzn.

Uważa się, że wysoka wartość entalpii rozwijania się kolagenu wynika głównie z rozrywania wiązań wodorowych znajdujących się pomiędzy potrójnymi helisami oraz wiązań wodorowych tworzących sieć

uwodnienia wokół cząsteczki kolagenu. Wartości entalpii (ΔH) dla endotermicznego przekształcenia kolagenu w krążkach międzykręgowych przedstawiono na rycinie 3 (b, d). Wyniki pokazują, że wartość ΔH maleje wraz z wiekiem pacjentów oraz stopniem zwyrodnienia.

Wnioski

- Szybkość ogrzewania ma wpływ na wartość temperatury denaturacji kolagenu w tkankach krążków międzykręgowych.
- Wyższa wartość temperatury przemiany postaci helikalnej kolagenu w postaci splotów w zwyrodniałych krążkach międzykręgowych sugeruje, że obecne są dodatkowe wewnątrzcząsteczkowe wiązania krzyżowe pomiędzy włóknami kolagenu.
- Temperatura denaturacji kolagenu w zwyrodniałych krążkach międzykręgowych jest mniejsza w krążkach pochodzących od mężczyzn w porównaniu z krążkami pochodzącymi od kobiet.
- Wyniki XRD potwierdzają obecność w kolagenie fazy krystalicznej oraz amorficznej.
- Choroba krążka międzykręgowego indukuje zmiany w strukturze kolagenu oraz prowadzi do powstawania dodatkowych wiązań krzyżowych pomiędzy włóknami kolagenu.

Piśmiennictwo:

1. Rich A., Crick F.H.C.: *The molecular structure of collagen*. *J. Mol. Biol.* 1961, 3: 483-506.
2. Fraser R.D.B., MacRea T.P., Suzuki E.: *Chain conformation in the collagen molecule*. *J. Mol. Biol.* 1979, 129: 463-481.

3. Bella J., Eaton M., Brodsky B., Berman H.M.: Crystal and molecular structure of collagen-like peptide at 1.9 Å-resolution. *Science* 1994, 266: 75-81.
4. Privalov P.L.: Stability of proteins which do not present a single co-operative system. *Advan. Protein Chem.* 1982, 25: 1-104.
5. Burjanadze T.V.: Thermodynamic substantiation of water-bridged collagen structure. *Biopolymers* 1992, 32: 941-949.
6. Flory P.J., Garrett R.R.: Phase transition in collagen and gelatin systems. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80: 4836-4845.
7. Bigi A., Cojazzi G., Roveri N., Koch M.H.J.: Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation. *Int. J. Biol. Macromol.* 1987, 9: 363-367.
8. Luescher M., Ruegg M., Scjindler P.: Effect of hydration on thermal stability of tropocollagen and its effect of hydration on thermal stability of tropocollagen and its dependence on the presents of neutral salts. *Biopolymers* 1974, 13: 2489-2503.
9. Sionkowska A., Kamińska A.: Thermal helix-coil transition in UV irradiated collagen from rat tail tendon. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999, 24: 337-340.
10. Usha R., Ramasami T.: The effects of urea and n-propanol on collagen denaturation: using DSC, circular dichroism and viscosity. *Termochimica Acta* 2004, 409: 2001-2006.
11. Doman I., Illes T.: Thermal analysis of the human intervertebral disc. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2004, 61: 207-214.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Sławomir Skrzyński

Klinika Neurochirurgii WIM

04-141 Warszawa, ul. Szaserów 128