



© J ORTHOP TRAUMA SURG REL RES

Conference materials

Materiały konferencyjne

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 – preliminary report

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

SŁAWOMIR SKRZYŃSKI¹, ALINA SIONKOWSKA², AGATA MARCINIAK²,
JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA²

¹ Klinika Neurochirurgii WIM CSK MON w Warszawie

² Wydział Chemii, Zakład Chemii Ogólnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Klinika Neurochirurgii WIM Centralnego Szpitala Klinicznego MON
ul. Szaserów 128, Warszawa, Poland

INTRODUCTION

Collagen is the main protein of connective tissue. It has great tensile strength, and it is the main component of ligaments and tendons. It is responsible for skin elasticity, and its degradation leads to wrinkles that accompany aging. Collagen also fills out the cornea where it is present in crystalline form. The native tropocollagen molecule (molecular mass 300 kDa) consists of three polypeptide chains of about 1000 amino acid residues each, wound round one another to form a triple helix. The atoms in the individual chains are held together with covalent bonds, while the three chains are held in the triple-helical structure by weaker bonds. When the protein is heat-denatured, these weak bonds are broken but the covalent bonds stay intact and the three chains separate from one another and collapse into random coils [1-3]. Collagen fibers in vivo must be stable enough to withstand the disruptive influence of thermal agitation, but capable of assembly and disassembly of the component molecules. In solution, the unfolding temperatures of a wide range of fibrous collagens are within only a few degrees of the animal's body temperature, but when the molecules are aggregated to form fibers there is an increase in the transition temperature of ~27°C [4-5]. Stability of the triple helix in collagen depends on hydrogen bonds. Thermal denaturation of collagen depends on water content, pH of environmental medium, and degree of cross-linking [6-10].

WPROWADZENIE

Kolagen jest głównym białkiem tkanki łącznej. Ma on bardzo dużą wytrzymałość na rozciąganie i jest głównym składnikiem więzadeł oraz ścięgien. Kolagen odpowiada za elastyczność skóry, a jego degradacja prowadzi do powstawania zmarszczek towarzyszących procesowi starzenia się. Ponadto, kolagen wypełnia rogówkę oka, 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, podczas gdy trzy łańcuchy łączą się ze sobą słabszymi wiązaniami, tworząc strukturę potrójnej helisy. Kiedy dochodzi do denaturacji cieplnej białka, słabsze wiązania ulegają rozpadowi, podczas gdy 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, ale jednocześnie zdolne do łączenia oraz odłączania tworzących je cząstek. W roztworze, temperatury w których dochodzi do rozwijania się szeregu postaci fibrylarnych kolagenu różnią się zaledwie o kilka stopni od temperatury organizmu, ale kiedy cząsteczki łączą się tworząc postacie fibrylarne dochodzi do zwiększenia temperatury przemiany do

This paper records an experiment that investigates calorimetrically the effect of disc disease on the collagen helix-coil transition for tissue extracted from patients during surgical operation. Intervertebral disc disease is one of the most common musculoskeletal disorders. Studies of the effect of disc disease on the properties of the collagen molecule are rather limited. However, degenerative disc disease and scoliosis affect the mechanical function of the tissue [11].

MATERIALS AND METHODS

Thirty 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. Tissues were scanned in a computer-controlled Perkin-Elmer DSC-7, fitted with an Intracooler, and running software supplied by the manufacturer (1991 revision) was used for the calorimetric measurements. Weighed samples (± 0.01 mg) were heated at 5°C per minute from -20°C to an appropriate specified temperature using an empty pan as a reference. In addition samples from four discs were examined with a scanning rate of 0.5°C per minute in the temperature range of 20 to 100°C .

The data allow the comparison between thermal stability of collagen tissue from healthy volunteers and from patients suffering from disc disease.

RESULTS AND DISCUSSION

DSC curves for collagen in healthy disc and collagen in disc degenerated by discopathy are presented in Figure 1 and Figure 2. The curves in Figure 1 have been obtained with heating rate of $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The curves in Figure 2 have been obtained with heating rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. As can be seen the heating rate has an influence on the position of denaturation temperatures of collagen in disc tissues. The helix-coil transition for collagen from healthy disc appears near 94.5°C (when DSC curves were recorded with heating rate $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$) and near 50°C (when DSC curves were recorded with heating rate $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). For collagen in degenerated disc DSC peak appears in the range $84-104^{\circ}\text{C}$ (when DSC curves were recorded with heating rate $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) and in the range $51-52^{\circ}\text{C}$ (when DSC curves were recorded with heating rate $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). The data is listed in Table 1.

$\sim 27^{\circ}\text{C}$ [4-5]. Stabilność potrójnej helisy kolagenu zależy od obecności wiązań wodorowych. Denaturacja ciepła 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. Próbki były przechowywane w roztworze izotonicznym podczas trwania badania DSC. Do oceny kalorymetrycznej użyto skanowania tkanek przy użyciu kontrolowanego komputera 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 $0,5^{\circ}\text{C}$ na minutę w zakresie temperatur od 20 do 100°C .

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

WYNIKI ORAZ OMÓWIENIE

Krzywe DSC dla kolagenu znajdującego się w zdrowym krążku międzykręgowym oraz w krążkach międzykręgowych dotkniętych procesem zwyrodnieniowym przedstawiono na Rycinie 1 oraz Rycinie 2. Krzywe na Rycinie 1 uzyskano podczas ogrzewania z prędkością $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Krzywe na Rycinie 2 uzyskano podczas ogrzewania z prędkością $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Jak widać, szybkość ogrzewania ma wpływ na wartość temperatury denaturacji kolagenu w tkankach krążków międzykręgowych. Przekształcanie się kolagenu z postaci helisy do postaci splotów dla zdrowych krążków międzykręgowych następuje w temperaturze około 94.5°C (gdy krzywe DSC były rejestrowane podczas ogrzewania z prędkością $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) oraz w temperaturze około 50°C (gdy krzywe DSC były rejestrowane podczas ogrzewania z prędkością $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Dla kolagenu pochodzącego ze zdegenerowanych krąż-

DSC profiles show that disc disease induced changes in molecular structure of collagen in disc tissue that alters position in DSC peak of collagen (highly energetic and sharp denaturation endotherm that is characteristic of the triple helix). Higher helix-coil transition temperature in collagen from degenerated disc suggests that additional intermolecular cross-linking of collagen fibers occurs. As a healthy disc came from female body we compare DSC curves for healthy and degenerated discs only for female disc (we did not have male healthy disc). However, we compared DSC curves of female degenerated discs and male degenerated discs. We observed that the maximum of peak responsible for thermal denaturation of collagen in male disc is in the range 80,95-97,87°C, whereas for female one it is in the range 86,25-104,47°C (Figure 3). It may suggest that collagen in female disc possesses more cross-linking linkages than collagen in male discs.

ków 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 były rejestrowane podczas ogrzewania z prędkością 0,5°C/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 zmieniło położenie wartości maksymalnej DSC dla kolagenu (wysoce energetyczna oraz ostra endoterma, 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

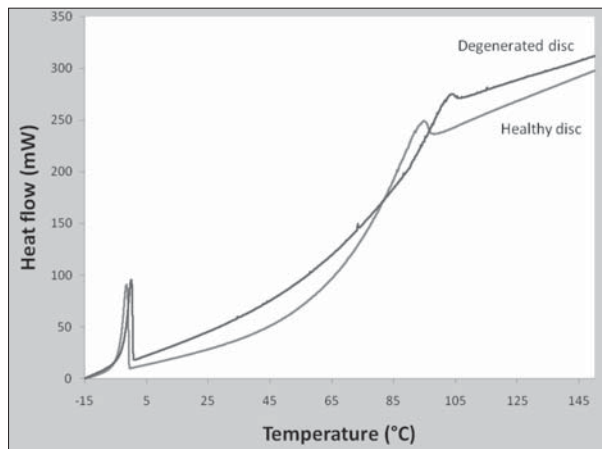


Fig. 1. DSC traces of healthy and degenerated disc samples heated with rate of 5°C per minute

Ryc. 1. Wartość DSC dla próbki zdrowej oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych ogrzewanych z prędkością 5°C na minutę [Przepływ ciepła (mW), Temperatura (°C), Krążek zwyrodniały, Krążek zdrowy]

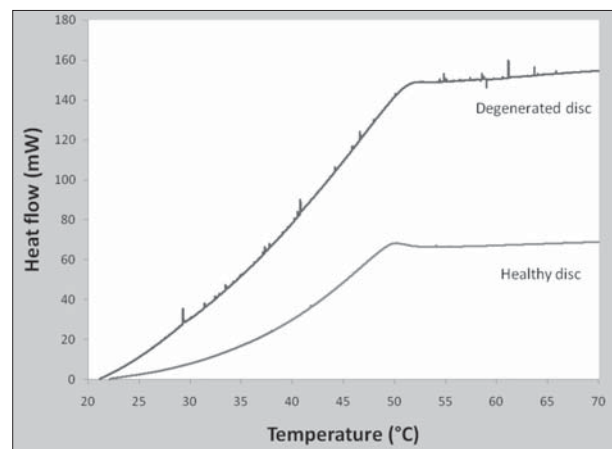


Fig. 2. DSC traces of healthy and degenerated disc samples heated with rate of 0.5°C per minute

Ryc. 2. Wartość DSC dla próbki zdrowej oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych ogrzewanych z prędkością 0,5°C na minutę [Przepływ ciepła (mW), Temperatura (°C), Krążek zwyrodniały, Krążek zdrowy]

Table 1. Calorimetric data for collagen in human disc heated with rate of 0.5°C per minute

	Patient's age	Sex	Peak temperature T_p , °C	Heat effect of collagen denaturation ΔH , J/g
Degenerated discs	26	M	51,88	10,6
	37	K	52,10	18,8
	60	K	51,17	25,8
Healthy disc	36	K	50,27	78,8

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 międzykręgowy	26	M	51,88	10,6
	37	K	52,10	18,8
	60	K	51,17	25,8
Zdrowy krążek międzykręgowy	36	K	50,27	78,8

The high enthalpy of unfolding of collagen is thought to derive mainly from the breaking of the hydrogen bonds between triple helixes and hydrogen bonds forming the hydration network around the collagen molecule. The enthalpy values (ΔH) for the endothermic transition of collagen in disc are shown in Figure 3 (b,d). The results show that ΔH decreases with the age of patients and degree of degeneration.

z organizmu kobiety (nie dysponowaliśmy krążkiem międzykręgowym pochodzącym od mężczyzny), porównaliśmy krzywe DSC dla zdrowego oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych. 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 80,95-97,87°C, podczas gdy dla kobiet wartość ta znajduje się w przedziale 86,25-104,47°C (Rycina 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

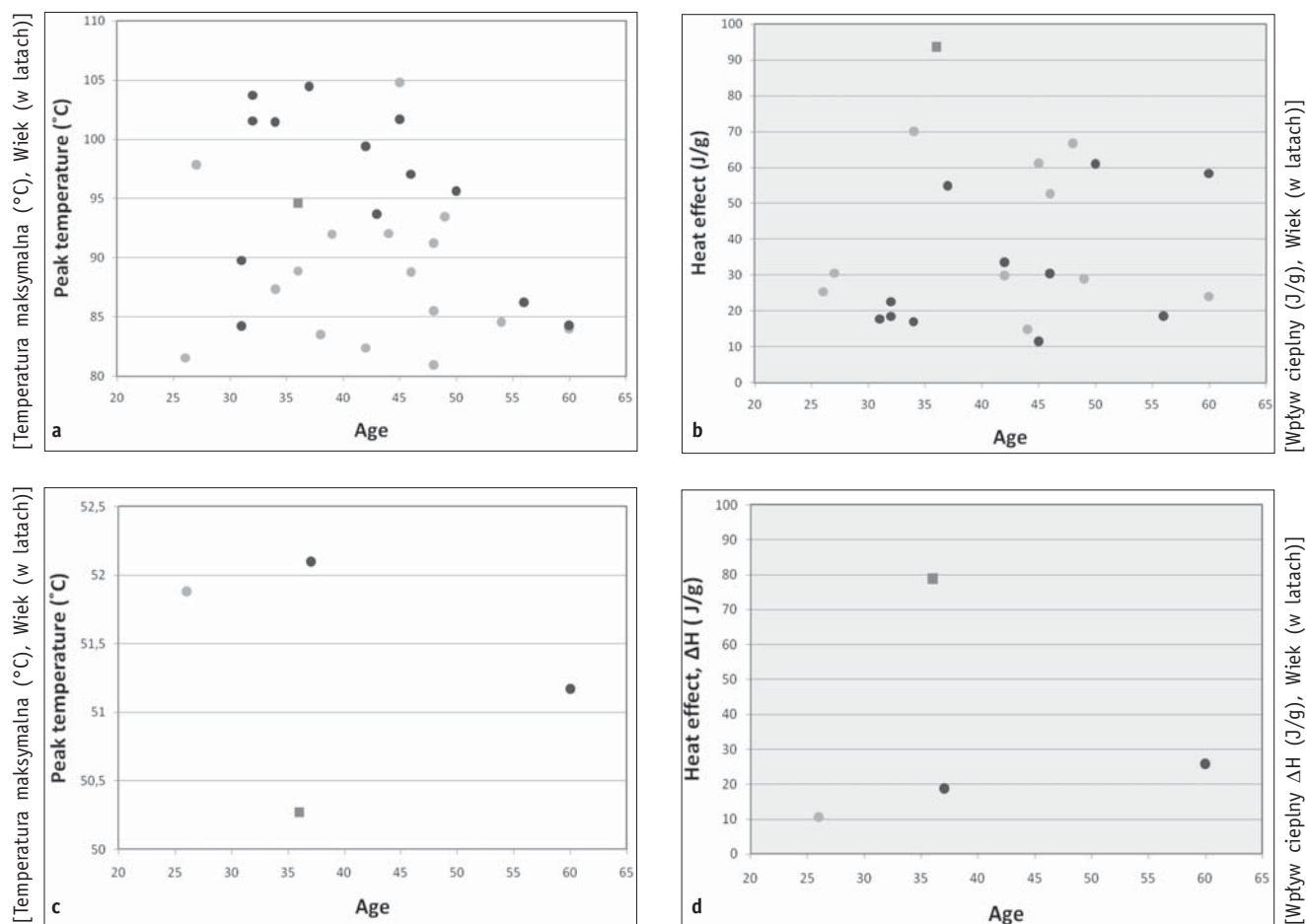
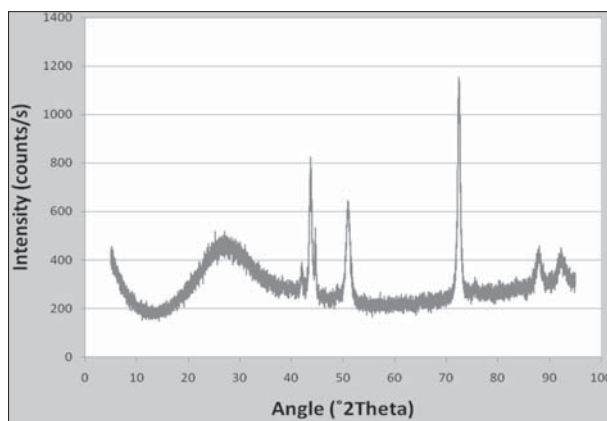


Fig. 3. Transition temperatures (a, c) and transition enthalpy (b, d) of healthy (■) and degenerated discs (○ for women, ● for men). **Ryc. 3.** Temperatury przemiany (a, c) oraz entalpia przemiany (b, d) dla zdrowego (■) oraz zwyrodniałych krążków międzykręgowych (○ kobiety, ● mężczyźni).

CONCLUSIONS

- The heating rate has an influence on the position on denaturation temperatures of collagen in disc tissues.
- Higher helix-coil transition temperature in degenerated disc collagen 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.
- XRD results confirmed the presence of crystal and amorphous phase in collagen.
- Disc disease induces changes in collagen structure and leads to formation of additional crosslinks between collagen fibers.



wokół cząsteczki kolagenu. Wartości entalpii (DH) dla endotermicznego przekształcenia kolagenu w krążkach międzykręgowych przedstawiono na Rycinie 3 (b,d). Wyniki pokazują, że wartość DH 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.

Fig. 4. XRD measurement of degenerated disc
Ryc. 4. Pomiary XRD zwyrodniałych krążków międzykręgowych [Intensywność (pomiarów/sek.) Kąt ($^{\circ}2\theta$)]

References/Piśmiennictwo:

1. Rich A, Crick FHC. The molecular structure of collagen. *J Mol Biol.* 1961;3:483-506.
2. Fraser RDB, MacRea TP, Suzuki E. Chain conformation in the collagen molecule. *J Mol Biol* 1979;129:463-481.
3. Bella J, Eaton M, Brodsky B, Berman HM. Crystal and molecular structure of collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* 1994;266:75-81.
4. Privalov PL. Stability of proteins which do not present a single co-operative system. *Advan Protein Chem* 1982;25:1-104.
5. Burjanadze TV. Thermodynamic substantiation of water-bridged collagen structure. *Biopolymers* 1992;32: 941-949.
6. Flory PJ, Garrett RR. Phase transition in collagen and gelatin systems. *J Am Chem Soc* 1958;80: 4836-4845.
7. Bigi A, Cojazzi, G, Roveri N, Koch MHJ. 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, Sejindler 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: 2001-206
11. Doman I, Illes T. Thermal analysis of the human intervertebral disc. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004; 61: 207-214.