УДК 547.962.9 *Оригинальная статья*

Морфологические особенности распада и восстановления фибриллярного коллагена, полученного ацетатной экстракцией из сухожильных оболочек

А.А. Гайдаш[1], А.И. Кулак[1], В.К. Крутько[1], О.Н. Мусская[1], К.В. Скроцкая[2], Е.Н. Крутько[1]
[1]ГНУ «Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси»
220072, Республика Беларусь, Минск, Сурганова, 9/1
[2]Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ
220006, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Ленинградская, д. 14
tsuber@igic.bas-net.by

DOI: 10.26456/pcascnn/2025.17.815

Аннотация: В гидролизатах сухожильных оболочек, полученных ацетатной экстракцией паравертебральных сухожилий лабораторных крыс, установлены стадии распада и репаративной регенерации фибриллярного коллагена. Показано, что коллагеновый материал разрушается по механизму спинодального распада. При этом основные анатомические фракции (сухожильная, сесамоидные островки) проявляют различную чувствительность к действию кислотного агента – наиболее устойчивы сесамоидные островки, что может быть обусловлено присутствием в экстрафибриллярном матриксе протеогликанов, устойчивых к ацетатному стрессу. Механизмы ассамблирования фибриллярного коллагена соответствуют принципу его иерархической организации. На мезоразмерном уровне преимущественными механизмами самосборки являются слияние «бок в бок» и «кончик в кончик», а конечными формами являются уни- и биполярные микрофибриллы. На наноразмерном уровне структурным механизмом роста фибриллярного коллагена является закручивание спиралей микрофибрилл преимущественно влево по мере созревания. На нанометровом уровне развитие фибрилл осуществляется по механизму интеркалярного роста с формированием разветвленных супрамолекулярных образований.

Ключевые слова: фибриллярный коллаген, ацетатный гидролиз, ассамблирование по механизмам «бок в бок», «кончик в кончик», интеркалирование.

Гайдаш Александр Александрович – д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории фотохимии и электрохимии ГНУ «Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси»
Кулак Анатолий Иосифович – академик НАН Беларуси, д.х.н., профессор, директор ГНУ «Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси»
Крутько Валентина Константиновна – к.х.н., доцент, заведующий лабораторией фотохимии и электрохимии ГНУ «Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси»
Мусская Ольга Николаевна – к.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории фотохимии и электрохимии ГНУ «Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси»
Скроцкая Катарина Владимировна – инженер научно-исследовательского института физико-химических проблем БГУ
Крутько Евгений Николаевич – старший научный сотрудник лаборатории фотохимии и электрохимии ГНУ «Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси»

Original paper

Morphological features of the breakdown and restoration of fibrillar collagen obtained by acetate extraction from tendon sheaths

A.A. Gaidash[1], A.I. Kulak[1], V.K. Krut'ko[1], O.N. Musskaya[1], K.V. Skrotskaya[2], E.N. Krutsko[1]
[1]Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Research Institute of Physical and Chemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus

DOI: 10.26456/pcascnn/2025.17.815

Abstract: In hydrolysates of tendon sheaths obtained by acetate extraction of paravertebral tendons of laboratory rats, the stages of disintegration and reparative regeneration of fibrillar collagen were established. It was shown that collagen material is destroyed by a mechanism of the spinodal

© А.А. Гайдаш, А.И. Кулак, В.К. Крутько, О.Н. Мусская, К.В. Скроцкая, Е.Н. Крутько, 2025

disintegration. In this case, the main anatomical fractions (tendon, sesamoid islets) exhibit different sensitivity to the action of an acidic agent - sesamoid islets are the most resistant, which may be due to the presence of proteoglycans resistant to acetate stress in the extrafibrillar matrix. The mechanisms of fibrillar collagen assembly correspond to the principle of its hierarchical organization. At the mesodimensional level, the predominant mechanisms of the self-assembly are «side-to-side» and «tip-to-tip» fusion, and the final forms are uni- and bipolar microfibrils. At the nanoscale level, the structural mechanism of fibrillar collagen growth is the twisting of microfibril spirals predominantly to the left as they mature. At the nanoscale level, fibril development occurs via the mechanism of intercalary growth with the formation of branched supramolecular formations.
Keywords: fibrillar collagen, acetate hydrolysis, assembly by side-to-side and tip-to-tip mechanisms, intercalation.

Alexander A. Gaidash – D. Sc., Professor, Leading Researcher, Photochemistry and Electrochemistry Laboratory, Institute of General and Inorganic Chemistry of the NAS of Belarus, ORCID: 0000-0002-2277-4643
Anatoly I. Kulak – Academician, D. Sc., Professor, Director of the Institute of General and Inorganic Chemistry of the NAS of Belarus, ORCID: 0000-0002-1398-3806
Valentina K. Krut'ko – Ph. D., Assistant Professor, Head of the Laboratory of Photochemistry and Electrochemistry, Institute of General and Inorganic Chemistry of the NAS of Belarus, ORCID: 0000-0002-1670-207X
Olga N. Musskaya – Ph. D., Assistant Professor, Leading Researcher, Photochemistry and Electrochemistry Laboratory, Institute of General and Inorganic Chemistry of the NAS of Belarus, ORCID: 0000-0002-9821-8969
Katarina V. Skrotskaya – Engineer, Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, ORCID: 0000-0002-0649-1125
Evgeny N. Krutsko – Senior Researcher, Photochemistry and Electrochemistry Laboratory, Institute of General and Inorganic Chemistry of the NAS of Belarus, ORCID: 0009-0005-7441-6986

Поступила в редакцию/received: 14.07.2025; после рецензирования/revised: 29.08.2025; принята/accepted 02.09.2025.

1. Введение

Механизмы распада и восстановления фибриллярного коллагена, подверженного действию жестких химических агентов (кислот, щелочей) во многом не изучены, что ограничивает понимание глубинных механизмов повреждения и регенерации соединительной ткани и сдерживает разработку коллагеновых материалов, предназначенных для применения в биоинженерных и имплантационных технологиях [1, 2]. Особое значение это имеет для регенераторной медицины, стремящейся к расширению сырьевых источников коллагенов, включая и герминативные ткани (плацента, пуповина), из которых выделяют коллагеновые материалы, состав, структура, химический и биологический функционалы которых во многом не ясны. К таким тканям относятся соединительнотканные оболочки сухожилий – перитеноны, содержащие метаболические и клеточные камбиальные компоненты, повышающие технологическую привлекательность данного сырья [3–5]. Цель работы – изучить структурные особенности распада и восстановления фибриллярного коллагена, полученного ацетатной экстракцией из сухожильных оболочек.

2. Материалы и методы

Соединительнотканные оболочки сухожилий вырезали из хвостов

крыс Вистар по методике, разработанной в Институте общей и неорганической химии НАН Беларуси, утвержденной этическим комитетом Института физиологии НАН Беларуси. Фибриллярный коллаген получен ацетатной экстракцией оболочек хвостовых сухожилий лабораторных крыс с использованием уксусной кислоты (х.ч. ледяная, АО «База №1 Химреактивов»), последующей нейтрализацией 0,34 М раствором гидроксида натрия (х.ч., ООО «СГС Хим») и прогреванием 0,5% водного раствора коллагена при 37°С в десятикратной среде 199 (Gibco, США) в течение 12 ч до образования прозрачного плёнчатого материала. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) пленку фиксировали в 1,5% водном растворе глутарового альдегида (25%, Thermo Scientific Chemicals, кат. номер MFCD00007025) и обезвоживали в водных растворах этанола (96,4% ректификованный, ОАО «Минск кристалл») восходящей концентрации, начиная с 30% с шагом по 10% до 96% по 30 мин в каждой градации, образцы высушивали, напыляли золотом на установке Emitech K550X (Англия) и изучали на микроскопе LEO 420 (Carl Zeiss, Германия).

3. Результаты и обсуждение

В пленке выявляются фрагменты коллагеновых фибрилл, а также разрозненные или собранные в полиморфные структуры нити фибриллярного коллагена. Фрагменты фибриллярного коллагена – это частицы, морфологически сходные с плотной частью домена фибриллярного коллагена. Размер частиц варьирует в пределах 120-160 нм, что близко к размерам двух доменов (два по 67 нм) плюс две четверти по 15 нм, смещенных вдоль длинной оси. Указанное соотношение размеров свидетельствует о том, что данные частицы являются фрагментами доменов фибриллярного коллагена, оказавшихся в свободном состоянии вследствие растворения уксусной кислотой тонкой части микрофибрилл, содержащей меньшее число нитей тропоколлагена (примерно на четверть относительно плотной части). На данной (достаточно ранней) стадии кислотный лизис фибриллярного коллагена, по-видимому, представляет собой упорядоченный поперечный распад по линии тонкой части фибрилл, где концентрируются стыковые отверстия доменов. Распад сопровождается агрегацией микрофибрилл в полиморфные связные структуры (см. рис. 1). Присутствие подобных структур свидетельствует о стремлении микрофибрилл к постлитическому восстановлению по механизмам слияния «кончик в кончик» и постпозиционного сращения [6]. Преимущественной формой репарирующих микрофибрилл являются простые линейные отрезки длиной до 1,5 мкм. Это значит, что доминирующим механизмом сборки

фибрилл является слияние «кончик в кончик», идущее, по-видимому, с участием протеогликанов, подавляющих по данным Graham [7] сращивание из стороны в сторону.

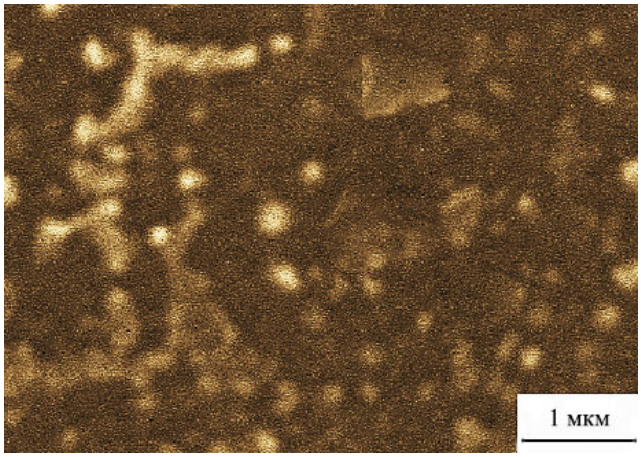

Рис. 1. СЭМ-изображение фибриллярного коллагена, ассоциированного в холестериноподобные супрамолекулярные структуры. Несущая нить свернута в чередующуюся по направлению спираль (доминирует левозакрученная).

Присутствие протеогликанов в инкубационной среде, возможно, является следствием их устойчивости кислотному воздействию. Микрофибриллы, растущие по механизму постпозиционного сращения, имеют вид агломератов (см. рис. 2), состоящих из смещенных по длинной оси удлиненных относительно прилежащих ассиметричных отрезков, формирующих деформированную нить длиной до 3 мкм [8, 9]. В эмбриогенезе подобный механизм свойственен формированию более зрелых фибрилл, но как следует из условий данного эксперимента, при восстановлении после кислотного стресса он может запускаться в довольно ранние сроки.

Нитчатый коллаген представлен полиморфными формами: ранними и относительно зрелыми фибриллами. По объему ранние фибриллы доминируют. Морфологически – это нити шириной ~160 нм и длиной до 10 мкм, состоящие из уни- и биполярных сегментов с соотношением ~1:1. Униполярные нити образуют однонаправленные спирали, витки которых закручены в одну сторону (левую или правую). На 1000 нм униполярной нити приходится 3-6 витков длиной до 10 нм. Витки биполярных спиралей в точках разветвлений фибрилл принимают разнонаправленный ход. Соотношение лево / право закрученных спиралей варьирует в пределах 3 / 1 – доминирование левозакрученных спиралей свидетельствует о тренде к структурной зрелости [10]. Зрелые фибриллы – это ветвящиеся формы длиной 3000-5000 нм, уширяющиеся в точках ответвлений до 350 нм. Практически все зрелые формы представляют собой спирали микрофибрилл с чередующимся направлением витков: в пределах одной

нити витки могут иметь лево- и правозакрученный ход. Ранние формы микрофибрилл разрознены. Относительно зрелые нити формируют супрамолекулярные структуры с боковыми линейными или полигональными ответвлениями.

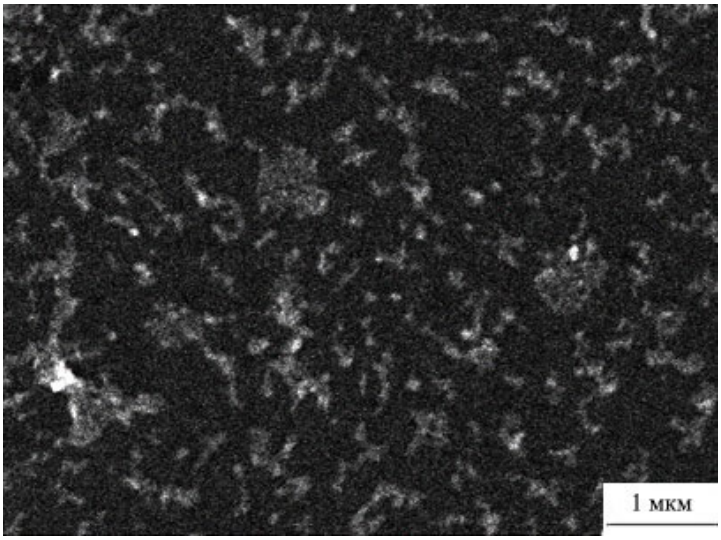

Рис. 2. СЭМ-изображение фибриллярного коллагена, собранного преимущественно по механизму постпозиционного сращения с формированием линейных нитчатых форм.

Останки сесамоидных островков размерами до 3 мкм являются фрагментами дезинтегрированной фибриллярной ткани с рассеянными по поверхности микросфероидами диаметром до 100 нм. Основу фрагментов составляют разволокненные неполосчатые (без поперечной периодичной исчерченности волокна), между которыми располагаются мелкие частицы детрита, чаще адгезированные к волокнам. Сесамоидные микросфероиды фиксированы к матриксу островков.

Структура нитчатых образований свидетельствует о том, что фибриллярный коллаген, испытавший кислотный стресс, подвергается иерархическому распаду и восстановлению. Деструкция коллагеновых микрофибрилл под воздействием ацетатного хаотропа осуществляется по механизму спинодального распада – фазового перехода, сопровождающегося продольным расслоением фибриллярного коллагена с высвобождением и выходом в объем неустойчивой мелкодисперсной фазы – разрозненных фрагментов плотной части доменов, накапливающихся в среде. Репаративная регенерация микрофибрилл на ранних этапах восстановления осуществляется по механизму слияния «кончик в кончик» и постпозиционного сращения с формированием преимущественно простых линейных нитчатых форм.

Эволюционным инструментом, лежащим в основе самосборки, является олигомеризация – объединение различных типов фибриллярного

коллагена в одну молекулу коллагена [11, 12]. Олигомеризация – механизм, который направлен на повышение устойчивости фибриллярного коллагена к действию фермента за счет повышения конформационного разнообразия типовых субъединиц, включенных в молекулу коллагена и, соответственно, снижения специфической активности протеаз.

4. Заключение

Приоритетные механизмы ассамблирования фибриллярного коллагена определяются уровнем его иерархической организации. На мезоразмерном уровне преимущественными механизмами самосборки являются слияние «бок в бок» и «кончик в кончик», а конечными формами являются уни- и биполярные микрофибриллы. На наноразмерном уровне структурным механизмом роста фибриллярного коллагена является закручивание спиралей микрофибрилл преимущественно влево по мере созревания. На нанометровом уровне развитие фибрилл осуществляется по механизму интеркалярного роста с формированием разветвленных супрамолекулярных образований.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганическая химия» по заданию 2.1.04.7.

Библиографический список:

1. **Summers**, **A.P.** The evolution of tendon – morphology and material properties / A.P. Summers, T.J. Koob // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 2002. – V. 133. – I. 4. – P. 1159-1170. DOI: 10.1016/s1095-6433(02)00241-6.
2. **Гайдаш, А.А.** Влияние температуры, микроструктуры и внутримолекулярной динамики фибриллярного коллагена на апатитогенез в скаффолдах / А.А. Гайдаш, А.И. Кулак, В.К. Крутько и др. // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. – 2025. – Т. 61, № 1. – С. 7-23. DOI: 10.29235/1561-8331-2025-61-1-7-23.
3. **Franchi**, **M.** Collagen structure of tendon relates to function / M. Franchi, A. Trirè, M. Quaranta et al. // The Scientific World Journal. – 2007. – V. 7. – P. 404-420. DOI: 10.1100/tsw.2007.92.
4. **Zhu**, **S.** Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications / S. Zhu, Q. Yuan, T. Yin et al. // Journal of Materials Chemistry B. – 2018. – V. 6. – I. 18. – P. 2650-2676. DOI: 10.1039/C7TB02999C.
5. **Гайдаш, А.А.** Структура и морфогенетические свойства коллагеновых матриц, полученных из соединительнотканных оболочек паравертебральных сухожилий / А.А. Гайдаш, А.И. Кулак, В.К. Крутько и др. // Успехи современной биологии. – 2024. – Т. 44. – № 3. – С. 265-290. DOI: 10.31857/S0042132424030024.
6. **Ingraham, J.M.** Is the tendon embryogenesis process resurrected during tendon healing? / J.M. Ingraham, R.M. Hauck, H.P. Ehrlich // Plastic & Reconstructive Surgery. – 2003. – V. 112. – I. 3. – P. 844-854. DOI: 10.1097/01.PRS.0000070180.62037.FC.
7. **Graham, H.K.** Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction / H.K. Graham, D.F. Holmes, R.B. Watson // Journal of Molecular Biology. – 2000. – V. 295. – I. 4. – P. 891-902. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3384.
8. **Birk, D.E.** Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development / D.E. Birk, M.V. Nurminskaya, E.I. Zycband // Developmental Dynamics. – 1995. – V. 202. – I. 3. – P. 229-243. DOI: 10.1002/aja.1002020303.
9. **Birk, D.E.** Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures / D.E. Birk, E.I. Zycband, S. Woodruff et al. // Developmental Dynamics. – 1997. – V. 208. – I. 3.

– P. 291-298. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<291::AID-AJA1>3.0.CO;2-D.
10. **Franchi, M.** Tendon and ligament fibrillar crimps give rise to left-handed helices of collagen fibrils in both planar and helical crimps / M. Franchi, V. Ottani, R. Stagni, A. Ruggeri // Journal of Anatomy. – 2010. – V. 216. – I. 3. – P. 301-309. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01188.x.
11. **Kadler, K.E.** Collagen fibril formation / K.E. Kadler, D.F. Holmes, J.A. Trotter, J.A. Chapman // Biochemical Journal. – 1996. – V. 316. – I. 1. – P. 1-11. DOI: 10.1042/bj3160001.
12. **Revell, C.K.** Modeling collagen fibril self-assembly from extracellular medium in embryonic tendon / C.K. Revell, J.A. Herrera, C. Lawless et al. // Biophysical Journal. – 2023. – V. 122. – I. 16. – P. 3219-3237. DOI: 10.1016/j.bpj.2023.07.001.

References

1. Summers A.P., Koob T.J. The evolution of tendon – morphology and material properties, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, vol. 133, issue 4, pp. 1159-1170. DOI: 10.1016/s1095-6433(02)00241-6.
2. Gaidash A.A., Kulak A.I., Krut'ko V.K. i dr., Vliyanie temperatury, mikrostruktury i vnutrimolekulyarnoj dinamiki fibrillyarnogo kollagena na apatitogenez v skaffoldakh [Effect of temperature, microstructure and intramolecular dynamics of fibrillar collagen on aptitogenesis in scaffolds], *Izvestiya Natsional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya khimicheskikh nauk [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Chemical Sciences.]*, 2025, vol. 61, issue 1, pp. 7-23. DOI: 10.29235/1561-8331-2025-61-1-7-23. (In Russian).
3. Franchi M., Trirè A., Quaranta M. et al. Collagen structure of tendon relates to function, *The Scientific World Journal*, 2007, vol. 7, pp. 404-420. DOI: 10.1100/tsw.2007.92.
4. Zhu S., Yuan Q., Yin T. et al. Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, vol. 6, issue 18, pp. 2650-2676. DOI: 10.1039/C7TB02999C.
5. Gaidash A.A., Kulak A.I., Krut'ko V.K. et al. The structure and morphogenetic properties of collagen matrixes obtained from connective tissue sheaths of para-vertebral tendons, *Biology Bulletin Reviews*, 2024, vol. 14, issue 64, pp. 758-778. DOI: 10.1134/S2079086424600413.
6. Ingraham J.M., Hauck R.M., Ehrlich H.P. Is the tendon embryogenesis process resurrected during tendon healing?, *Plastic & Reconstructive Surgery,* 2003, vol. 112, issue 3, pp. 844-854. DOI: 10.1097/01.PRS.0000070180.62037.FC.
7. Graham H.K., Holmes D.F., Watson R.B. Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction *Journal of Molecular Biology*, 2000, vol. 295, issue 4, pp. 891-902. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3384.
8. Birk D.E., Nurminskaya M.V., Zycband E.I. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development, *Developmental Dynamics*, 1995, vol. 202, issue 3, pp. 229-243. DOI: 10.1002/aja.1002020303.
9. Birk D.E., Zycband E.I., Woodruff S. et al. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures, *Developmental Dynamics*, 1997, vol. 208, issue 3, pp. 291-298. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<291::AID-AJA1>3.0.CO;2-D.
10. Franchi M., Ottani V., Stagni R., Ruggeri A. Tendon and ligament fibrillar crimps give rise to left-handed helices of collagen fibrils in both planar and helical crimps, *Journal of Anatomy*, 2010, vol. 216, issue 3, pp. 301-309. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01188.x.
11. Kadler K.E., Holmes D.F., Trotter J.A., Chapman J.A. Collagen fibril formation, *Biochemical Journal*, 1996, vol. 316, issue 1, pp. 1-11. DOI: 10.1042/bj3160001.
12. Revell C.K., Herrera J.A., Lawless C. et al. Modeling collagen fibril self-assembly from extracellular medium in embryonic tendon, *Biophysical Journal*, 2023, vol. 122, issue 16, pp. 3219-3237. DOI: 10.1016/j.bpj.2023.07.001.