

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МУЛТИДИСЦИПЛИНАРНЕ ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Ирена Д. Милер

**Структурне промене колагена у дермису
коже пацова током старења и у дијабетесу –
корелативна примена конвенционалних и
напредних микроскопских метода**

докторска дисертација

Београд, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES

Irena D. Miler

**Structural changes of collagen in the dermis of
the skin during aging and in diabetes –
correlative application of conventional and
advanced microscopic methods**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Ментори:

Др Александра Кораћ, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Др Михаило Рабасовић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за физику-Институт од националног значаја за Републику Србију

Чланови Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације:

Др Бато Кораћ, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет и научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ -Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Сања Стојановић, доцент, Универзитет у Нишу-Медицински факултет

Др Мирјана Мићевић, научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за физику-Институт од националног значаја за Републику Србију

Датум одбране _____

Ова докторска дисертација урађена је на Универзитету у Београду, у институцијама: Биолошком факултету, Институту за биолошка истраживања „Синиша Спанковић“-Институту од националног значаја за Републику Србију, Институту за физику-Институту од националног значаја за Републику Србију.

АФМ је рађен на School of Science, European University Cyprus.

Раманови спектри снимани су на Пољопривредном факултету у Лабораторији за флуоресцентну микроскопију и Раманову спектроскопију.

*...Ову докторску дисертацију посвећујем мојој светлости, мојој снази,
мојој лавици, мојој највољенијој баки Милојки....Недостајеш ми и
волим те бесконачно...*

Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода

Сажетак

Ова теза се бави испитивањем колагена I дермиса пацова на свим хијерархијским нивоима његове грађе, у физиолошким и патолошким условима. Са том идејом дисертација је подељена на три целине, чији закључци међусобно корелирају и који се међусобно допуњују у одговору на главно питање, а то је како се понаша колаген у датим условима, да ли можемо да утичемо, предвидимо и побољшамо његово стање (уколико је нарушено), и на који начин. Прва целина се бави истраживањем ефеката кумулативног оксидативног притиска на дермис коже пацова током хронолошког старења. Користећи напредне технике осликавања, модалитете мултифотонске микроскопије – генерацију другог хармоника (енг. Second harmonic generation, SHG) и двофотонску ексцитирану флуоресценцију (енг. Two Photon Excited Fluorescence, TPEF), анализирани су промене колагена на парафинским пресецима коже пацова различитих старосних група (15 дана, 1 месец и 21 месец). Резултати су показали да се методом поларизације другог хармоника (енг. Polarization resolved second harmonic generation, PSHG) прецизно детектују промене у влакнима колагена повезана са хронолошким старењем, што је у складу са конвенционалним методама микроскопије. Такође, примећено је да оксидативна оштећења доводе до суптилних промена које резултирају уређенијом структуром молекула колагена. Ови резултати сугеришу потенцијал за примену PSHG као брзе и методе без обележивања узорака за анализу колагена код фиксираних узорака. Друга целина дискутује о изазовима у разумевању структуре колагена I у физиолошким условима и уводи L-аргинин као регулатор ремоделовања коже. Кроз мултимодалну анализу која укључује микро-Раманову спектроскопију, мултифотонску и електронску микроскопију, студија истражује ремоделовање колагена I након дуготрајног третмана L-аргинином. Резултати показују да L-аргинин доводи до појаве тањих влакана колагена и њиховог мање уређеног (реџер) распореда, што указује на обнову дермиса коже. Овај ефекат се приписује повећаном садржају пролин/хидроксипролина и нитрацији тирозина у колагену I. Резултати иду у прилог томе да овај мултимодални приступ може помоћи у биоинжењерингу дермалних заменика на бази колагена у сврху регенерације и старења, тј. у практичној примени код регенеративне и „anti-aging” медицине. Трећа целина истражује структурне промене колагена I дермиса пацова током дијабетеса и након краткорочног третмана L-аргинином, користећи напредне микроскопске и спектроскопске методе за дијагнозу. Резултати показују да су у раној фази дијабетеса, колагенска влакна делимично оштећена, што доводи до њихове хетерогености. Третман L-аргинином са једне стране директно умањује ове конформационе промене, а са друге повећава синтезу аминокиселина пролина и хидроксипролина. Резултати сугеришу да би L-аргинин могао бити користан у превенцији раних оштећења колагена у дијабетичној кожи али и у њиховом ублажавању, истичући његов потенцијални терапијски значај у дијабетесу и стањима повезаним са дијабетесом.

Кључне речи: дермални колаген тип I, хронолошко старење, дијабетес, L-аргинин, мултифотонска микроскопија, PSHG, микро-Раманова спектроскопија, трансмисиона електронска микроскопија, микроскопија на бази атомских сила

Научна област: Биолошке науке

Ужа научна област: Биофотоника

Structural changes of collagen in the dermis of the skin during aging and in diabetes – correlative application of conventional and advanced microscopic methods

Abstract

This thesis deals with the examination of the rat dermis, with special focus on collagen I and all its hierarchical levels of structure under physiological and pathological conditions. With this idea in mind, the dissertation is separated into three parts, whose conclusions correlate and complement each other in response to the main question: how does collagen behave under given conditions? Can we influence, predict, and improve its condition (if compromised), and in what way? The first part investigates the effects of cumulative oxidative stress on the rat skin during aging, focusing on collagen, the main component of the dermis. Using advanced imaging techniques, such as Second Harmonic Generation (SHG) and Two Photon Excited Fluorescence (TPEF), changes in collagen on paraffin sections of rat skin of different age groups were analyzed. The results showed that the Polarization Resolved Second Harmonic Generation (PSHG) method precisely detects changes in collagen fibers associated with chronological aging, consistent with conventional microscopy methods. Additionally, it was observed that oxidative damage leads to subtle changes, resulting in a more organized structure of collagen molecules. These results suggest the potential application of PSHG as a rapid, label-free method for collagen analysis in fixed samples. The second part discusses the challenges of understanding the structure of collagen I under normal physiological conditions and introduces L-arginine as a regulator of skin remodeling. Through multimodal analysis involving micro-Raman spectroscopy, multiphoton, and electron microscopy, the study explores the remodeling of collagen I after long-term treatment with L-arginine. The results show that L-arginine leads to thinner collagen fibers and a "softer" arrangement, indicating dermis rejuvenation. This effect is attributed to increased proline/hydroxyproline content and tyrosine nitration in collagen I. The results suggest that this multimodal approach may assist in engineering collagen-based "skin substitutes" for regeneration and aging purposes, *i.e.*, in practical applications in regenerative and anti-aging medicine. The third part investigates structural changes in rat dermal collagen I during diabetes and after short-term treatment with L-arginine using advanced microscopic and spectroscopic diagnostic methods. The results show that in the early stages of diabetes, collagen fibers are partially damaged, resulting in heterogeneous patterns. However, L-arginine treatment reduces these conformational changes induced by diabetes, reflected in the increased synthesis of the amino acid proline and hydroxyproline, as shown in the previous segment, indicating altered collagen content. The results suggest that L-arginine could be useful in both the treatment and prevention of early collagen damage in diabetic skin, highlighting its potential therapeutic importance in the complications that diabetes causes on the skin as well as in the prevention of their occurrence.

Key words: dermal collagen I, chronological aging, diabetes, L-arginine, multiphoton microscopy, PSHG, micro-Raman spectroscopy, transmission electron microscopy, atomic force microscopy

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biophotonics

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1 Хистолошка и цитолошка организација коже сисара	1
1.1.1 Фибробласти-ћелије дермиса које синтетишу компоненте ЕСМ	2
1.1.2 Колаген	3
1.2 Кожа пацова као модел за проучавање дермалних односно колагенских промена.....	5
1.3 Структурне промене дермалног колагена током хронолошког старења – нов методолошки приступ.....	5
1.4 Структурне промене дермалног колагена током третмана L-аргинином– методолошки приступ.....	7
1.5 Структурне промене дермалног колагена у дијабетесу – методолошки приступ	8
2. ЦИЉЕВИ ДИСЕРТАЦИЈЕ	11
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	12
3.1 Модел хронолошког старења дермиса пацова	12
3.1.1 Припрема узорака за светлосну и трансмисиону електронску микроскопију.....	12
3.1.2 Експериментална поставка за TPEF и SHG микроскопију.....	13
3.1.3 Осликавање и анализа слике.....	14
3.1.4 Имунохистохемија.....	15
3.1.5 Статистичка анализа	16
3.2. Модел ремоделирања дермиса пацова третманом L-аргинином	16
3.2.1 Експериментални дизајн	16
3.2.2 Припрема и снимање узорака.....	16
3.2.3 Експериментална поставка за Раманову спектроскопију	16
3.2.4 Анализа Раманових спектра	17
3.3 Модел експериментално изазваног дијабетеса типа 1 и третмана L-аргинином.....	17
3.3.1 Протокол за третман експерименталних животиња	17
3.3.2 Припрема узорка коже, PSHG снимање и рачунање β коефицијента.....	18
3.3.3 Раманова спектроскопија и анализа	18
3.3.4 AFM анализа	18
3.3.5 Осликавање узорака бојењем пикросиријус црвеним	18
4. РЕЗУЛТАТИ	20
4.1 Модел хронолошког старења дермиса пацова	20
4.1.1 Поређење светлосне са модалитетима мултифотонске микроскопије – TPEF и SHG.....	20
4.1.2 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика	21
4.1.3 TEM анализа	22

4.1.4 Имунохистохемијска детекција 4-HNE и N-Тур	24
4.2 Модел ремоделирања дермиса пацова третманом L-аргинином	24
4.2.1 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика	24
4.2.2 TEM анализа	25
4.2.3 Анализа Рамановом спектроскопијом	27
4.2.4 Имунохистохемијска детекција N-Тур	31
4.3 Модел експериментално изазваног дијабетеса типа 1 и третмана L-аргинином	31
4.3.1 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика	31
4.3.2 Анализа Рамановом спектроскопијом	33
4.3.3 AFM анализа и анализа бојењем пикросиријус црвеним	38
5. ДИСКУСИЈА	40
5.1 Модел хронолошког старења дермиса пацова	40
5.1.1 Поређење светлосне са модалитетима мултифотонске микроскопије – TPEF и SHG	40
5.1.2 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика	41
5.1.3 TEM анализа	42
5.1.4 Имунохистохемијска детекција 4-HNE & N-Тур	42
5.2 Модел ремоделирања дермиса пацова третманом L-аргинином	43
5.2.1 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика	43
5.2.2 TEM анализа	43
5.2.3 Анализа Рамановом спектроскопијом	43
5.3 Модел експериментално изазваног дијабетеса типа 1 и третмана L-аргинином	45
5.3.1 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика	45
5.3.2 Анализа Рамановом спектроскопијом	45
5.3.3 AFM анализа и анализа бојењем пикросиријус црвеним	47
6. ЗАКЉУЧЦИ	49
7. ЛИТЕРАТУРА	51

1. УВОД

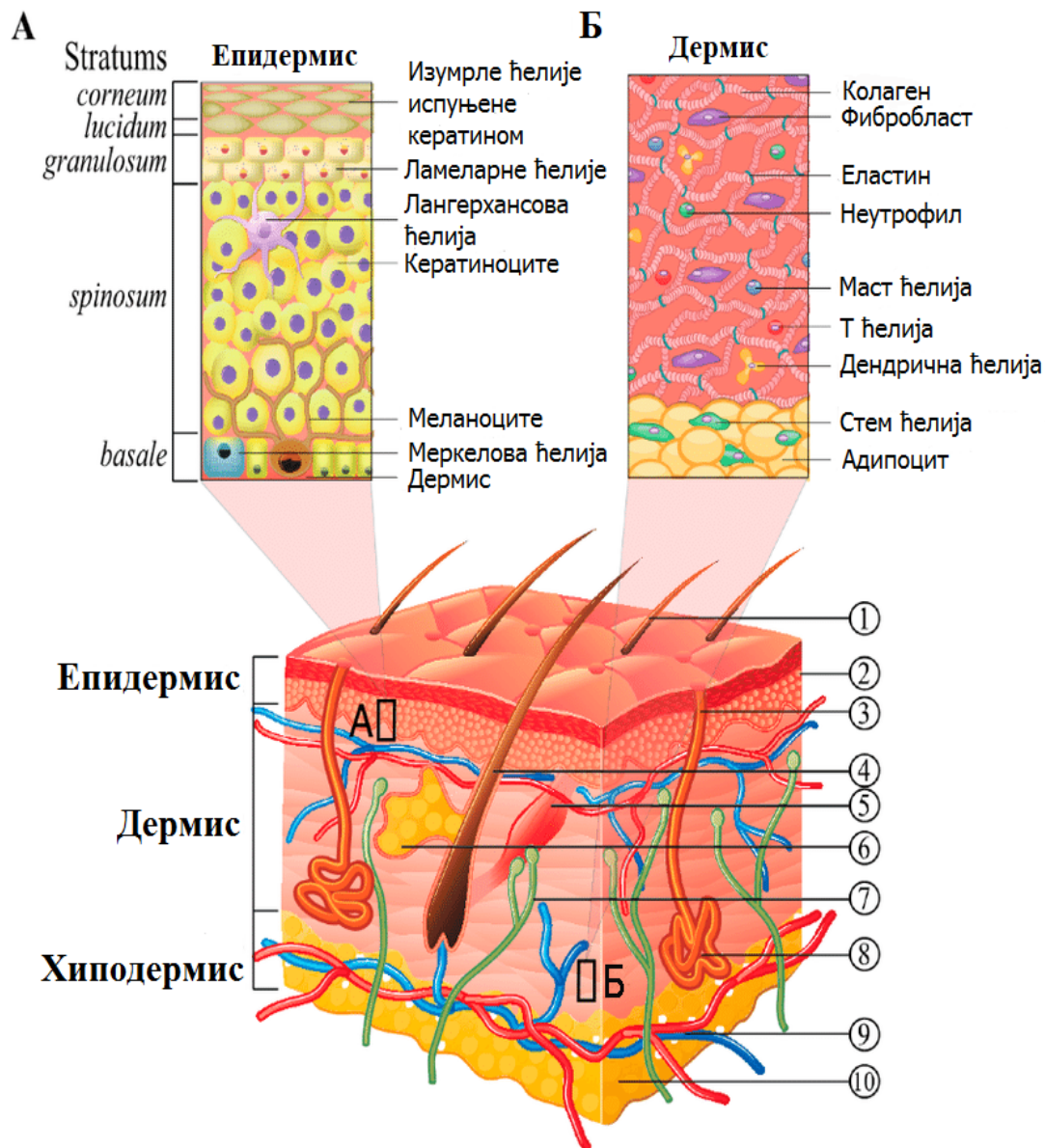
1.1 Хистолошка и цитолошка организација коже сисара

Кожа је један од највећих органа сисара која чини око 16% телесне масе и остварује бројне функције од којих је најважнија заштита од механичких повреда, УВ зрачења, уласка патогена и нежељених супстанци у организам. Осим заштитне, кожа такође служи као сензитивни орган богат нервима, регулише телесну температуру, учествује у метаболизму масти, воде и соли.

Хистолошки, кожа је организована у три слоја: епидермис, дермис и хиподермис (Слика 1). Епидермис је вишеслојни, кератизирани епител изграђен од четири типа ћелија: кератиноцита (најзаступљеније од свих ћелија, синтетишу кератин и липопротеине чинећи тако кожу непропусном за воду), меланоцита (синтетишу меланин који штити кожу од УВ зрачења), Лангерхансових ћелија (антиген-презентујуће ћелије – прва линија одбране имунског система коже) и Меркелових ћелија (сензорна функција – механорецептори за додир)(Michael H.Ross & Wojciech Pawlina, 2014). За разлику од кератиноцита организованих у три до четири слоја (од обнављајућег, базалног, до мртвог, орожалог), меланоцити се налазе уз базални слој епитела и распоређени су у односу 1:10 у односу на кератиноците, чинећи меланоцитно-кератиноцитну јединицу. Лангерхансове и Меркелове ћелије су релативно малобројне, а Лангерхансове могу напуштати епидермис.

Дермис је везивно ткиво које се налази непосредно испод епидермиса, пружајући му потпору и повезујући га са поткожним ткивом, односно хиподермисом. Саграђен је од ванћелијског матрикса (енг. extracellular matrix, ECM), и ћелија које га синтетишу. У дермису се такође налазе фоликули длаке, знојне и лојне жлезде, као и крвни и лимфни судови. Чине га два слоја која која нису јасно разграничена али се могу поделити на спољашњи папиларни, и унутрашњи ретикуларни слој. Папиларни слој гради растресито везивно ткиво у коме се налазе ћелије фибробласти, мастоцити, макрофаге. Колагени фибрили који се налазе у овом слоју се још називају и усидравајући, јер су једним крајем причвршћени за подепителну ламину, а другим делом улазе у дермис. Ретикуларни слој представља густо везивно ткиво, које у свом саставу има више колагених влакана а мање ћелија. Дермис такође садржи и еластична влакна која су дебља у ретикуларном слоју. Дермис садржи чак 80% воде углавном повезане са протеогликанима, док се у епидермису ова вредност смањује на 10-13% (Niczyporuk, 2018).

Хиподермис је последњи слој коже сачињен углавном од белог масног ткива и мишића.

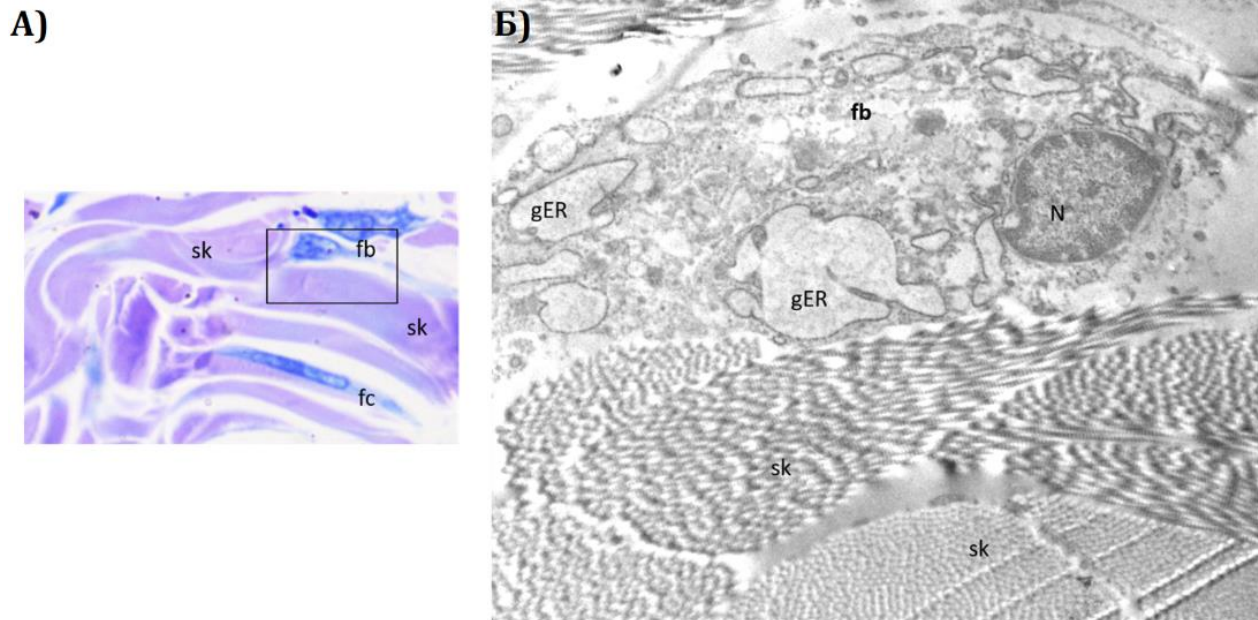


Слика 1. Схематски приказ хистолошке и цитолошке организације коже сисара. Бројеви на слици означавају: (1) длаку; (2) *stratum corneum* (рожнати слој); (3) извод знојне жлезде (пора); (4) фоликул длаке; (5) мишић; (6) лојну жлезду; (7) нерв; (8) знојну жлезду; (9) крвни судови; (10) масно ткиво. Секције (А) и (Б) истичу детаљну структуру епидермиса и дермиса. [Преузето од Massella и сар., (2019) и измењено].

1.1.1 Фибробласти-ћелије дермиса које синтетишу компоненте ЕСМ

Фибробласти су специјализоване ћелије које производе протеине који граде ЕСМ (Слика 2). То су ћелије које синтетишу прекурсоре колагених влакна и матриксне молекуле. Структура и назив ових ћелија варира у зависности од активности у синтези ЕСМ компоненти (синтетски активни фибробласти и синтетски неактивни фиброцити).

Морфологијом подсећају на мезенхимске ћелије од којих воде порекло, тело им је спљоштено, вретенасто, са израженим, дугачким цитоплазматским наставцима. У цитоплазми активних фибробласта се осим овалног, централно постављеног нуклеуса налазе и бројне органеле укључене у синтезу протеина, гранулисани ендоплазмични ретикулум (енг. granular endoplasmic reticulum, gER), њему придружен комплекс Голџија и бројне везикуле. Фибробласти који нису синтетски активни (фиброцити), су мањи и тамнији због значајно смањене количине цитоплазме и синтетских органа (Tigges и сар., 2014; Plikus и сар., 2021).

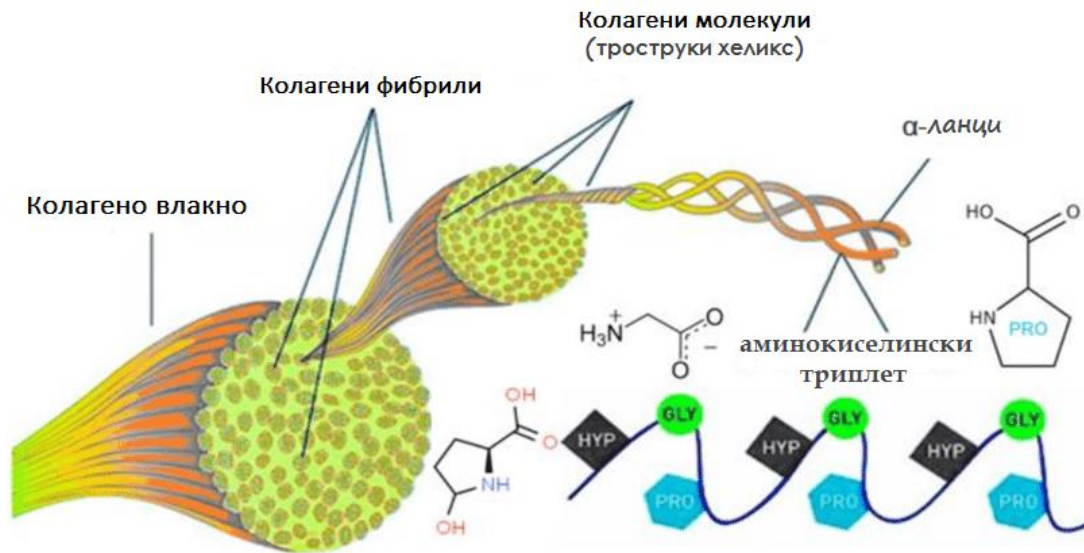


Слика 2. А) Полутанки пресек дермиса коже пацова бојен базним фуксином и метилен плавим (BF&MB). fb-фибробласт; fc-фиброцит; sk-снопови колагена. Увећање x 100, оригинал. Б) Танки пресек дермиса коже пацова. fb-фибробласт; N-нуклеус; gER- гранулисани ER; sk-снопови колагена. Увећање x 6300, оригинал.

Дермални фибробласти су бројни и синтетишу главну компоненту ЕСМ коже – колаген.

1.1.2 Колаген

Колаген је назаступљенија компонента дермиса, односно ванћелијског матрикса. Колагени представљају хетерогену породицу фибриларних и солубилних протеина од којих постоји 28 различитих типова окарактерисаних код кичмењака (Ricard-Blum, 2011). Код животиња, колаген представља најзаступљенији протеин у организму и доминантни протеин унутар ЕСМ (Shoulders & Raines, 2009).



Слика 3. Схематски приказ структуре колагена. [Преузето од Rastogi и сар., (2022) и измењено].

На структурном нивоу, сви молекули колагена се састоје од три полипептидна α ланца насинтетисана у gER, који формирају хомо- или хетеротримере (Слика 3). Типичан α ланац у свим фибриларним колагенима састоји се од приближно 338 понављајућих Gly-X-Y- триплета, где је Gly аминокиселина глицин, а X и Y могу бити било које аминокиселине, иако су најчешће пролин и хидроксипролин. На крајевима тро-хеликалног мотива налазе се два неколагена домена, N- и C-пропептид (терминус). Структура троструког хеликса настаје преплитањем три α ланца почевши од C-терминалног пропептида, формирањем десноруког суперхеликса који се даље стабилизује хидроксилацијом одређених лизинских и пролинских остатака (O-везана гликозилација). Овај молекул, тако специфично обрађен у комплексу Голџија представља прекурсор колагена, назива се проколаген и цевастог је облика (дужине 300 nm и пречника 1,5 nm). Проколаген се затим пакује у везикуле за пренос до мембране ћелије и избацавање у ванћелијски простор. У ванћелијском простору, унутар фибропозитора, екструзија ћелијске мембране које се пружају са површине фибробласта, од њега се формира зрели колаген уклањањем N- и C-пропептида путем ензима металопроотеиназа специфичних за тип колагена. Зрели молекули колагена се тада спајају како би формирали микрофибриле на површини ћелије (Kadler и сар., 1996). Микрофибрили се могу спајати и расти и уздужно и аксијално. Растојање између два хеликса унутар фибрила назива се D-период, и износи приближно 67 nm (Orgel и сар., 2014), док се дијаметар фибрила креће од 50 до 200 nm. Да би се од фибрила формирала зрела колагена влакна, лизил-оксидазе ковалентно умрежавају лизинске (или хидроксилизинске) остатке унутар супрамолекуларног склопа, обезбеђујући стабилност и механичка својства. Дијаметар колагених влакана се креће од 0,5-3 μ m (C. Y. Liu и сар., 2015).

У овој тези предмет истраживања је фибриларни колаген, и то колаген типа I, који је најзаступљенији у кожи и одликује се не-центро-симетричном структуром. Иако ће се у даљем тексту користити термин колаген, мисли се искључиво на дермални колаген типа I.

1.2 Кожа пацова као модел за проучавање дермалних односно колагенских промена

Пацови се често користе као животињски модел за проучавање патолошког стања и њихових компликација или за процену ефикасности терапије. Кожа пацова се најчешће користи за испитивање процеса старења (Domínguez-Oliva и сар., 2023). Наиме, дермис пацова садржи у највећем проценту колаген, дајући кожи значајну отпорност, као и гипкост и еластичност (Dorsett-Martin, 2004). Дебљина дермиса је променљива и зависи од површине тела. Најдебља кожа се налази на леђима и а најтања на капцима. Дебљина дермиса се повећава са годинама пацова и достиже вредности од 100 μm до 3 mm (Niczyporuk, 2018).

Детаљна анализа морфологије дермалног колагена је критична за процену структурних модификација фибриларног матрикса пошто су често повезани са различитим физиолошким и патолошким процесима, као што су старење и дијабетес, зарастање рана и рак (Dorsett-Martin, 2004; Russell-Goldman & Murphy, 2020; Diller & Tabor, 2022; Jiang и сар., 2024). Предмет истраживања ове тезе биће детаљне структурне промене дермалног колагена током хронолошког старења, третмана L-аргинином и дијабетеса на моделу коже пацова, кроз испитивање биофотоничких особина колагена и увођењем нових методолошких приступа.

1.3 Структурне промене дермалног колагена током хронолошког старења – нов методолошки приступ

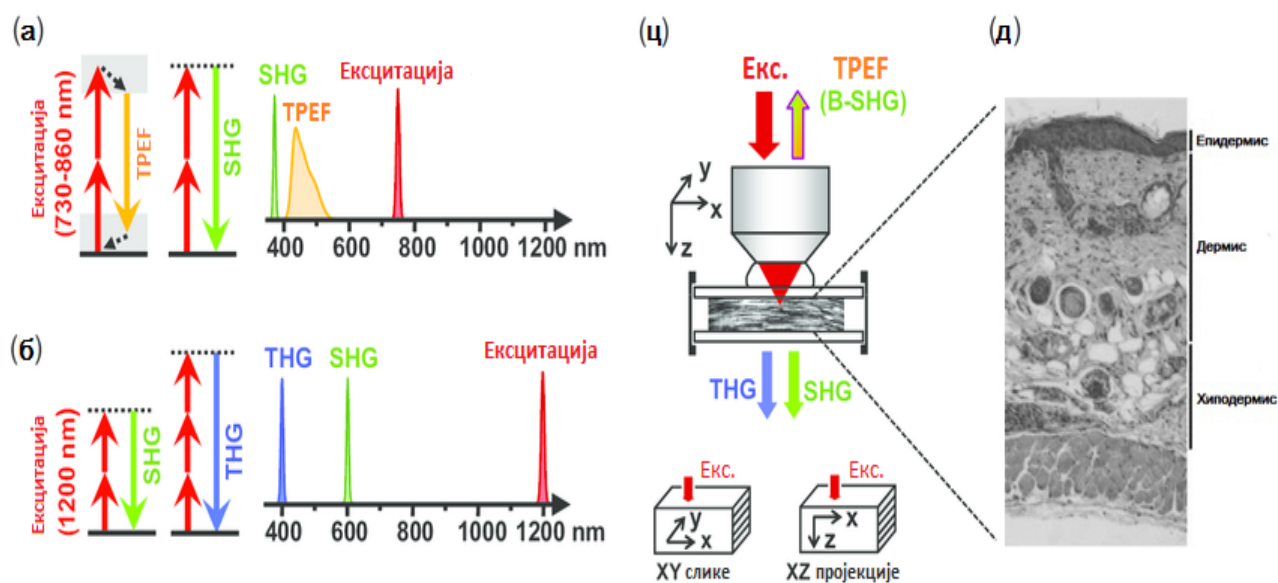
Старење коже је комплексан феномен који укључује хронолошко и фото-старење. Оба ова процеса су по својој молекулској основи оксидативни процеси који доводе до мањих или већих оштећења структурних компоненти коже. Најчешће коришћени методи за визуализацију колагена су конвенционално хистолошко бојење хематоксилин-еозином (енг. hematoxylin and eosin, H&E), хистохемија (ван Гизон бојење, пикросиријус ред бојење), имунохистохемија и електронска микроскопија. Ови методи су често веома скупи, троше доста времена а и утичу на саму структуру молекула. Наиме, хемијске промене утичу на молекулску структуру и могу се јавити током процедуре припреме узорка за микроскопирање. Примена нових и напредних метода заснованих на мултифотонској

микроскопији (енг. Nonlinear laser scanning microscopy, NLSM) показује обећавајуће резултате као и у превазилажењу овог проблема (Parodi и сар., 2020).

NLSM је техника осликавања која користи ултра-кратке ласерске импулсе, са два модалитета: TPEF и SHG. TPEF микроскопија пружа значајно смањену фототоксичност и фотоизбељивање у поређењу са, на пример, конфокалном или епи-флуоресцентном микроскопијом, док су код SHG микроскопије, фотоизбељивање и фототоксичност сведени на минимум (Cicchi и сар., 2010; Baria и сар., 2018; Dudenkova и сар., 2019; Poole & Mostaço-Guidolin, 2021). Ове карактеристике долазе углавном због блиског-инфрацрвеног светла које се користи при осликавању TPEF и SHG микроскопијом због пута без интеракције ласерског зрака кроз узорак, осим у малој фокусној запремини где је снага довољно висока. Сва ова горепоменућа својства повећавају дубину пенетрације за нелинеарно осликавање, што га чини супериорнијим за *in vivo* снимање данас (Horton и сар., 2013; Aghigh и сар., 2023). Штавише, TPEF и SHG су коришћени у мултимодалним студијама осликавања истовремено са трећим хармоником (енг. Third harmonic generation, THG) (Слика 4), као још једним модалитетом мултифотонске микроскопије. THG микроскопија такође не захтева било какво обележавање и третирање узорка, а открива, на још једном нивоу, комплементарне информација које можемо добити од узорака (You и сар., 2018; Zhang и сар., 2019; Gavgiotaki и сар., 2020).

Бројне студије су показале да је SHG микроскопија најбољи тренутно доступан избор за испитивање колагених влакана и њихове структурне промене у ткивима. Молекулска структура колагена, његова не-центро-симетрична структура, задовољава критеријуме за генерисање сигнала другог хармоника (Williams и сар., 2005; Cicchi и сар., 2013, 2014; Cicchi & Ravone, 2017; Mostaço-Guidolin и сар., 2017). Колаген типа I производи најјачи SHG сигнал јер има најуређенију структуру од свих описаних врста колагена кичмењака (Roth & Freund, 1981; Dudenkova и сар., 2019). Сви ови разлози доприносе да се број студија које користе предности TPEF и SHG осликавања, било *ex vivo* или *in vivo*, значајно повећава последњих година.

Међутим, ови методи и даље имају ограничену примену због недостатка стандардизације протокола, посебно у погледу броја потребних узорака и корелације резултата са конвенционалним методима микроскопије.



Слика 4. Принципи мултифотонског снимања. (а) SHG/TPEF са побудом у опсегу од 730 до 860 nm. (б) THG/SHG са ексцитацијом од 1200 nm. (ц) Експериментални распоред и усмереност сигнала. Осликавање се врши паралелно са површином коже. Приказане слике су или XY аквизиције или XZ репројекције (Преузето од Artel и сар., (2010) и измењено). (д) Хистолошки пресек коже миша, приказан за поређење са сликама нелинеарне микроскопије. (Преузето од Paz и сар., (2014) и измењено).

1.4 Структурне промене дермалног колагена током третмана L-аргинином– методолошки приступ

У дермису, матрикс колагена снажно утиче на механичка својства коже; сходно томе, његов састав, конформација, ултраструктура и поравнање влакана/3D организација су блиско повезани. Колагена хијерархијска организација обухвата троструке алфа-хеликсне јединице на молекуларном нивоу као и фибриле и влакна на супра-молекуларном нивоу. Дакле, његова микроархитектура зависи од састава аминокиселина и њихове интермолекуларне и интерфибриларне везе (Ottani и сар., 2002). Најзаступљеније аминокиселине у кожи пацова поред глицина су пролин и хидроксипролин (Ricard-Blum, 2011; Li & Wu, 2018). Током синтезе прекурсора колагена у фибробластима пролин може бити изведен из различитих аминокиселина (Wu и сар., 2011), а након тога посттранслационо се може модификовати у хидроксипролин, неопходан за састављање влакана (de Souza и сар., 2017; Van Gulick и сар., 2019). Аминокиселина L-аргинин може послужити као прекурсор синтезе колагена путем пролинског пута. Истовремено, L-аргинин је супстрат за синтезу азот-моноксида (енг. Nitric oxide, NO) и стога је укључен у многе важне регулаторне механизме у дермису коже (Albina и сар., 1993; Adler & Friedman, 2015; Man и сар., 2022). NO је посредник у зарастању рана кроз индукцију синтезе колагена

(Albina и сар., 1988; Schäffer и сар., 1997), инхибицију матриксних металопроотеиназа MMP9 и деградацију колагена (O'Sullivan и сар., 2014).

Осликавање и биомолекуларна карактеризација дермалне архитектуре је од кључног значаја за боље разумевање механизма физиолошких и патолошких процеса. Бројне технике су коришћене за добијање података у вези са биохемијским и структурним променама колагена које утичу на биомеханичке и физиолошке особине коже. PSHG је моћан и веома осетљив метод за структурну карактеризацију колагена и 3D организацију. Широко се користи за испитивање молекулских промена и архитектонског ремоделирања колагенске матрице у различитим ткивима у физиолошким и патолошким процесима (зарастање и стварање рана, дијабетеса, рака итд.) (Van Gulick и сар., 2019). Недавно се показало све веће интересовање за микро-Раманову спектроскопију (надаље у тексту Раманова спектроскопија) као средство за карактеризацију компоненти ванћелијског матрикса (Bergholt и сар., 2019), посебно за анализу конформационих промена у молекулу колагена. Раманова спектроскопија је неинвазивна техника која омогућава брзо стицање слике уз минималну припрему или чак икакве без припреме узорка. Уз помоћ Раманове спетроскопије дефинисани су спектрални профили одређених веза у молекулу колагена, омогућавајући идентификацију биохемијских промена које се јављају у колагену у различитим фазама физиолошких и/или патофизиолошких процеса (Martinez и сар., 2019).

1.5 Структурне промене дермалног колагена у дијабетесу – методолошки приступ

Дијабетес је комплексан метаболички поремећај узрокован недостатком синтезе инсулина, која аутоматски утиче на смањену ескрецију или недовољну активацију. Према Међународној федерацији за дијабетес, дијабетес је једна од најраспрострањенијих болести, узрокујући преко милион смртних случајева сваке године (Magliano & Bouko, 2021). Рана дијагноза као и благовремени третман, заједно са побољшаном контролом пацијента, може смањити компликације и понудити могућност заустављања даље прогресије болести ако се препозна у раној претклиничкој фази. Код дијабетеса, висок ниво глукозе у крви (хипергликемија) узрокује оштећење ткива, ремети хомеостазу органа и доводи до озбиљних медицинских компликација. Упркос њиховом значајаном доприносу дијабетесу, патолошке промене коже често остају занемарене. Хипергликемија изазива низ промена биохемијских процеса у кожи који воде до повећаног нивоа реактивних врста кисеоника (енг. Reactive oxygen species, ROS) и смањене синтезе NO (González и сар., 2023). Као резултат редокс неравнотеже, узрокују се метаболичке промене које мењају функцијска и механичка својства коже. То укључује промене у циркулацији крви (микроциркулације) као и проблеме са нервним и соматосензорним системом, што доводи до различитих типова неуропатија (Figueroa-Romero и сар., 2008).

Поред тога, NO недостатак доводи до лоше исхране и терморегулације коже, смањеног регенеративног капацитета, инфекција, слабог зарастања рана и развоја чирева на кожи код дијабетичара (Black и сар., 2003; Goulding, 2015). Компликације у дијабетесу доводе до измењеног састава ванћелијског матрикса, упала, апоптозе ендотелних ћелија, инхибиције пролиферације и миграције кератиноцита, биосинтезе протеина, поремећене фагоцитозе и хемотаксије различитих ћелија, смањеног број фибробласта и тиме до смањене синтезе колагена (Blakutny & Jude, 2009; Buranasin и сар., 2018; Y. Liu и сар., 2022).

Претходне студије су показале да су механичка својства колагена измењена код дијабетеса и да дезорганизација колагенских фибрила и фрагментације наноразмера могу довести до екстензивног поремећаја интегритета дермалног колагена (Argyropoulos и сар., 2016; Dremin и сар., 2021). Истраживања на дијабетичном анималном моделу су показала да се последице поремећаја редокс стања (утицај на NO) на кожи јављају у раној фази болести (Janković и сар., 2016). Сnižена NO синтеза у дијабетичном стању је, такође, последица значајно смањене концентрације L-аргинина у плазми као и у многим ткивима (Gambardella и сар., 2020; Forzano и сар., 2023). Промене у L-аргинин/NO хомеостази могу се надокнадити суплементацијом L-аргином и, на тај начин утицати на обнављање NO сигнализације.

Поред својих ефеката на ендотелну релаксацију и васкуларну функцију, позитивни ефекти L-аргинина у дијабетесу доводе до системског побољшања енергетске хомеостазе. Два главна ефекта имају директан утицај на панкреас, а то су индукција β -ћелијске регенерације (Vasiljević и сар., 2007) и регулација синтезе и секреције инсулина (Leiss и сар., 2014; Gheibi & Ghasemi, 2020).

Корисни ефекти L-аргинина у дијабетесу су описани у студијама и на животињама као и људима, *in vivo* и *in vitro*. Ове студије су показале да унос L-аргинина значајно побољшава метаболизам глукозе и осетљивост на инсулин (Mohan & Das, 1998; Forzano и сар., 2023). Такође, доводи до смањења концентрације глукозе у крви и рестаурације нивоа инсулина у циркулацији до нивоа контроле (Vasiljević и сар., 2007; Janković и сар., 2019). Важно је нагласити да се L-аргинин суплементација сматра сигурном и значајном у спречавању и одлагању оштећења ткива дијабетесом (Dubey и сар., 2022), повећава ефикасност превенције и лечења поремећаја изазваних на кожи, у раној фази смањује ризик од компликација и чини могућим да се предупредe, чак и преокрену негативни ефекти последица које оставља болест. Напредне биолошке и медицинске технике коришћене су за добијање података везаних за анализу биохемијских и структурних промена на сваком хијерархијском нивоу колагена. Оптичка дијагностика, затим различите врсте техника спектромикроскопије, које пружају информације о биомеханичким и физиолошким својствима коже, успешно се користе у клиничкој пракси. Конкретно, поларизационе методе се користе за процену микроструктурних промена на кожи изазваних раком, дијабетичним ранама, опекотинама, неуродегенерацијом као и последицама изазваним старошћу или дијабетесом (Dremin и сар., 2021). Веома ефикасан и осетљив алат за карактеризацију колагене структуре је PSHG (Hristu и сар., 2022).

У скорије време, Раманова спектроскопија је коришћена као алат за карактеризацију компоненти ванћелијског матрикса, посебно у патолошким условима (Bergholt и сар., 2019). Такође је важно креирати технике за корелативну анализу која може открити биохемијске промене у колагену у различитим фазама нормалних и/или патолошких физиолошких процеса. Ово је неопходно за стварање прецизне терапије. На основу априорних података подржаних информацијама из неинвазивних оптичких техника осликавања, адекватна терапија ће омогућити брз одговор и зауставити прогресију болести. За правилно корелисање структуре колагена са својим механичким својствима, микроскопија на бази атомских сила (енг. Atomic force microscopy, AFM) је идеалан алат. AFM је јединствен и моћан метод за анализу структура и својства узорка без њиховог уништавања (Stylianou и сар., 2019). Тренутно, AFM првенствено проучава структуру и механичка својства нанобиоматеријала на бази колагена, интеракције између колагена и супстрата током формирања танких филмова колагена, интеракције колагена са ћелијама и интеракције колагена са зрачењем (Stylianou, 2017).

У овој тези смо интегрисали мултиплексни приступ помоћу оптичке дијагностике за анализу промена дермалног колагена у дијабетесу и након краткотрајног третмана L-аргинином.

2. ЦИЉЕВИ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Свака промена колагена као структурне и функцијске компоненте ванћелијског матрица дермиса коже значајно утиче на њену улогу органа за комуникацију како са спољашњом, тако и са унутрашњом средином. Стога је као главни циљ истраживања у оквиру дисертације постављено корелативно праћење структурних промена дермиса током физиолошких (старење) и патолошких промена (дијабетес типа 1) коже пацова конвенционалним и напредним микроскопским методима. Наиме, користећи исте узорке, промене испитане напредним микроскопским техникама биле би корелисане са конвенционалним методима, да би се добио увид у молекулски основ структурних промена колагена.

У оквиру овог циља, дефинисани су појединачни циљеви истраживања кроз три модела:

1. Испитати структурне промене дермиса коже пацова на нивоу молекула колагена, фибрила и влакна током хронолошког старења;
2. Испитати ефекат дуготрајног третмана L-аргинином на ремоделирање колагена и структурне промене дермиса коже пацова на нивоу молекула колагена, фибрила и влакна;
3. Испитати ефекат краткотрајног третмана L-аргинином на структурне промене дермиса коже пацова на нивоу молекула колагена, фибрила и влакна, у циљу ублажавања и/или заустављања промена насталих током експериментално изазваног дијабетеса типа 1.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1 Модел хронолошког старења дермиса пацова

3.1.1 Припрема узорака за светлосну и трансмисиону електронску микроскопију

За анализу светлосном и трансмисионом електронском микроскопијом (ТЕМ), користили смо узорке коже од по три мушка пацова соја Wistar старости 15 дана, 1 месец и 21 месец, који су претходно прикупљени, рутински фиксирани и укалупљени у парафин или смолу Аралдит (детаљно описано у Јанковић и сар., 2019). Парафински блокови су сечени серијски на пресеке дебљине 5 μm , монтирани на микроскопске плочице, депарафинисани ксилолом и рехидратисани серијом алкохола опадајуће концентрације до воде. Тако добијени пресеци ткива су коришћени необележени за TPEF и SHG микроскопију, док смо за конвенционалну микроскопију користили бојење H&E. Наиме, за корелативно снимање, после TPEF и SHG осликавања, испитани узорци заједно са њиховим серијским паровима су рутински обојени H&E, дехидратисани и монтирани за анализу светлосном микроскопом (Leica DMLB microscope, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Користећи два сета серијских парова, оба обојена H&E смо упоредили и корелисали у целини и кроз морфологију ткива, као и структуру и организацију колагена.

Аралдитни калупи узорака коже истих региона анализираних светлосном микроскопијом (SM), сечени су на пресеке дебљине 1 μm (полутанки пресеци) или 80 nm (танки пресеци), користећи Leica UC6 ултрамикротом (Leica Microsystems). Полутанки пресеци су монтирани на микроскопске плочице и бојени двојно BF&MB. Танки пресеци су стављани на бакарне мрежице и контрастирани у Leica EM STAIN (Leica Microsystems). Пресеци су били посматрани на Leica DMLB светлосном микроскопу или Philips CM12 трансмисионом електронском микроскопу (Philips/FEI, Eindhoven, Netherlands) опремљеним дигиталном камером (SIS MegaView III, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). Са електронмикрографија добијених снимањем танких пресека, мерен је пречник колагених фибрила у трипликату. Укупан број насумично одабраних, мерених фибрила био је 70/230/218 по групи, на узорцима пацова старих 15 дана/1 месец/21 месец, тим редом. Сва мерења и анализе су извршене коришћењем iTEM софтвера (Olympus Soft Imaging Solutions).

3.1.2 Експериментална поставка за TPEF и SHG микроскопију

TPEF и SHG слике су снимане на микроскопу који је развијен на Институту за физику у Београду (Схема 1). Поступак је детаљно описан у претходно објављеном раду (Rabasović и сар., 2015). Укратко опис микроскопа је: зрачење титанијум-сафирног (Ti:Sa) ласера са синхронизованим модовима (MIRA 900, Coherent, Inc., CA, USA) је подешено на 730 nm за TPEF, и 840 nm за SHG осликавање. Ласерско зрачење је линеарно поларизовано што омогућава PSHG мерења. Зрак најпре наилази на неутралне филтере који су коришћени за контролу снаге ласерског зрачења. Затим зрачење наилази на пар галвоскенирајућих огледала (Cambridge technology) који служе да се фокусиран ласерски снап помера произвољно по узорку. Онда снап наилази на проширивач снопа који шири ласерски снап да би испунио задњу апертуру објектива. Затим наилази на дихроично огледало које рефлектује зрачење таласне дужине веће од 700 nm (ласер), а пропушта зрачење мањих таласних дужина (сигнал). Рефлектовано зрачење се фокусира на узорак микроскопским објективом Zeiss EC Plan-Neofluar 40x NA = 1,3. TPEF или SHG сигнали се сакупљају истим објективом, што се често назива ЕПИ или рефлектујућа конфигурација. Сигнали затим пролазе кроз поменуто дихроично огледало и филтрирају одговарајућим филтерима. За TPEF сигнал је коришћен широкопојасни филтер (400-700) nm. За SHG сигнал је коришћен ускопојасни филтер ширине 10 nm са максимумом трансмисије на 420 nm. Сигнали се на крају детектују фотомултипликатором. Енергија ласерских импулса на узорку је била у опсегу 40 pJ до 60 pJ за TPEF модалитет, а 80 pJ до 100 pJ за SHG модалитет. Одговарајуће густине снаге у фокусу су процењене на 4 MW/cm² до 6 MW/cm² и 8 MW/cm² до 10 MW/cm², респективно (претпостављајући да је зрачење фокусирано до дифракционог лимита).

За PSHG мерења, додатни поларизатор, то јест, анализатор је додат у детекцију. Он се налази у носачу који омогућава ротацију, то јест детектовање различитих поларизација сигнала. Поларизација ласера на узорку је линеарна и одређена је поларизацијом ласера и коришћеном оптиком која не нарушава значајно поларизацију зрачења. Зато је процењено да је елиптичност ласерског зрачења била занемарљива.

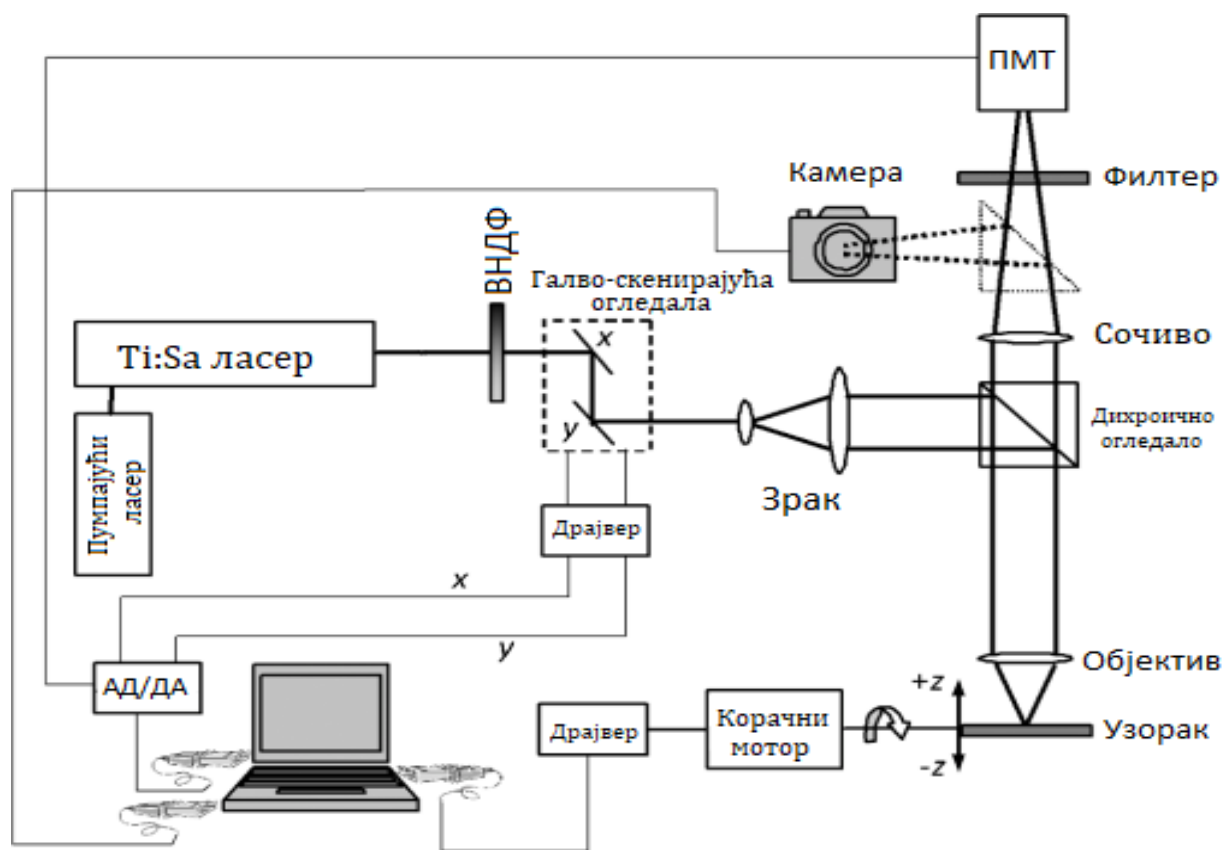


Схема 1. Експериментална поставка нелинеарног микроскопа (НЛМ). ПМТ је фотомултипликатор за детекцију сигнала ТРЕФ и SHG, а ВНДФ је неутрални филтер променљиве оптичке густине за подешавање снаге ласера, док је АД/ДА дигитална аквизициона картица. Путања ласерског зрака је нацртана дебелим линијама, док је електрична мрежа нацртана танким линијама. (Преузето од Rabasović и сар., (2015) и измењено).

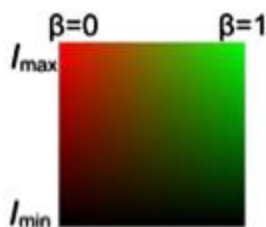
3.1.3 Осликавање и анализа слике

Прва хиперполаризација или β коефицијент је рачунат са PSHG слике (Birk и сар., 2014) по формули:

$$\beta = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} представљају SHG интензитет пиксела слике детектован кроз анализатор оријентисан паралелно и нормално на упадну поларизацију ласера, респективно. Упадна поларизација ласера је била константна током мерења, као и паралелна са хоризонталном осом свих слика. Вредност β коефицијента је израчуната према датој формули у сваком

пикселу из вредности $I_{||}$ и I_{\perp} , за сваки пиксел одговарајућих слика. Мапа β вредности приказана на слици 5:



Слика 5. Мапа β вредности кодиране бојом.

β је кодиран бојом, и I представља интензитет SHG сигнала у датом пикселу према просечној вредности две слике снимљене кроз анализатор, оријентисане паралелно и нормално на упадну поларизацију ласера. Резултати одговарају мапи β вредности.

Према Chen и сар., (2012), гранични случај када је $\beta=1$, одговара потпуном поравнању фибриларног колагена. У овом случају, SHG интензитети су максимални на слици снимљеној кроз анализатор оријентисан паралелно са упадном поларизацијом ласера, док је SHG интензитет једнак 0 за слику када је анализатор оријентисан нормално на упадну поларизацију ласера.

β коефицијент је израчунат на стандардном компјутеру користећи сопствени код за Math Lab. Време израчунавања за слику резолуције 1024×1024 је у просеку 5 до 10 секунди. Програм није оптимизован; тако, време израчунавања може бити још краће.

Дакле, једноставну процедуру коју је описао Chen и сар., (2012) и коју смо применили овде је лако имплементирати, и довољна је да се добију потребне информације о великом броју узорака (нпр. скрининг).

3.1.4 Имунохистохемија

Полутанки пресеци коже из аралдитних калупа коришћени су за анализу присуства и локализације 4-хидроксинонена (4-HNE) и 3-нитротирозина (N-Tyr) са примарним антителима anti-4-HNE (1:400, ab48506, Abcam, Cambridge, UK) и anti-N-Tyr (1:100, MAB5404, Chemicon, Houston). Поступак рутинске имунохистохемије је претходно детаљно описан од стране Јанковић и сар., (2019). Укратко, након испирања, пресеци су инкубирани са авидин-биотин-пероксидаза комплексом (ABC peroxidase kit, Vector Labs, Burlingame, USA) према упутству произвођача. Пероксидазна реакција развијена је стандардним коришћењем 3'-3'-диаминобензидин тетрахидрохлорида (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Сви

пресеци су били контрастно обојени хематоксилином, дехидратисани и монтирани за анализу SM.

3.1.5 Статистичка анализа

За статистичку обраду података коришћена је анализа варијансе (ANOVA) GraphPad Prism софтвера (GraphPad Prism, Version 5.03). $P \leq 0,05$ је узето као вредност од значаја.

3.2. Модел ремоделирања дермиса пацова третманом L-аргинином

3.2.1 Експериментални дизајн

Мужјаци пацова хибридног соја Mill Hill старости два и по месеца, подељени су у три групе, свака од по шест животиња. Једна група је добијала L-аргинин HCl (2,25%) (NOS супстрат), друга група N ω -nitro-L-аргинин метил естар (L-NAME HCl, 0,01%) (NOS инхибитор) у води за пиће 45 дана, док је трећа, нетретирана група, која је пила чесменску воду, служила као контрола. Пацови су држани у појединачним кавезима под стандарним лабораторијским условима ($24 \pm 1^\circ\text{C}$; режим осветљења 12h светло/12h тама), и добијали су храну и воду за пиће *ad libitum*. Експеримент је одобрила Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Београд, и Управа за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије.

3.2.2 Припрема и снимање узорака

Узорци коже су припремљени на исти начин као што је претходно описано (поглавље 3.1.1). Укратко, за анализе су коришћени претходно припремљени парафински узорци коже и узорци коже у аралдиту, од три животиње по групи. За мултимодално снимање, парафински блокови су исечени на пресеке дебљине 5 μm и монтирани на микроскопске плочице, што је резултирало вишеструким сетовима серијских пресека од сваке животиње. Након PSHG снимања, израчунатог β коефицијента (претходно детаљно описан (Chen и сар., 2012; Miler и сар., 2021)) и Раманове спектроскопије, необојени препарати су коришћени за имунохистохемијску детекцију N-Тур (Anti-N-Тур; 1:100, МАВ5404, Chemicon, Houston). Такође, поступак припреме и анализе на нивоу електронске микроскопије био је идентичан претходно описаном (поглавље 3.1.1).

3.2.3 Експериментална поставка за Раманову спектроскопију

Исти необојени парафински пресеци су анализирани Рамановом спектроскопијом, са ласерским снопом усмереним директно на колагена влакна. Раманови спектри су измерени помоћу спектрометра Horiba Jobin Yvon XploRA опремљеног решетком од 1200 зареза/mm. Раманско расејање је побуђено ласером таласне дужине од 532 nm. Ниска снага ласера коришћена је због спречавања термичког разлагања узорака. Спектрална резолуција је била $\sim 3 \text{ cm}^{-1}$, а калибрација је изведена са 520.5 cm^{-1} Рамановом позицијом силицијума. Спектри су забележени са 9 различитих локација на сваком узорку са временом излагања од 120 секунди.

3.2.4 Анализа Раманових спектра

Раманови спектри су анализирани коришћењем пакета hyperspec у програмском језику „R“. Позадински сигнал је апроксимиран полиномом првог реда и одузет од спектра и спектри су нормализовани према њиховим интегралним интензитетима. Анализа главних компоненти (енг. Principal Component Analysis, PCA) примењена је на спектре све три експерименталне групе. Анализиран је спектрални опсег ($700\text{-}1800$) cm^{-1} . Промене у Рамановим спектрима су праћене поређењем усредњених спектра анализираних ткива и вредности резултата које одговарају специфичним PCA векторима. Пошто су трендови уочени у усредњеним спектрима у складу са PCA анализом, приказани су само средњи спектри.

3.3 Модел експериментално изазваног дијабетеса типа 1 и третмана L-аргинином

3.3.1 Протокол за третман експерименталних животиња

Мужјаци пацова хибридног Mill Hill соја старости три месеца, подељени су у две групе: дијабетични и не-дијабетични. Пацови су држани у појединачним кавезима под стандарним лабораторијским условима ($24 \pm 1^\circ\text{C}$; режим осветљења 12h светло/12h тама). Животиње из прве групе су након 12-часовног периода гладовања, интраперитонално примиле једну дозу алоксана (Sigma, Germany) у концентрацији од 120 mg по kg телесне масе ради изазивања дијабетеса типа 1. Концентрација глукозе у крви је мерена свакодневно, и пацови са нивоом глукозе у крви $\geq 12 \text{ mMol L}^{-1}$ (GlucSure тест, „Prizma“ Крагујевац, Србија) су сматрани дијабетичним. Третман дијабетичних пацова започет је након изазивања дијабетеса и трајао је недељу дана. Обе групе, дијабетична и не-дијабетична су додатно подељене у две подгрупе: једна подгрупа је добила L-аргинин HCl (2,25%) (Sigma, Germany) у води за пиће, док је друга, нетретирана подгрупа пила

чесменску воду и служила је као контрола. Пацови су држани у појединачним кавезима са храном и водом за пиће *ad libitum*. Свака експериментална подгрупа се састојала од три животиње. Експерименте је одобрила Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду и Управа за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије.

3.3.2 Припрема узорка коже, PSHG снимање и рачунање β коефицијента

Припрема пресека и анализа узорка коже пацова рађена је на начин који је детаљно описан у претходно објављеном раду (Miler и сар., 2021) и претходним потпоглављима (3.1.1 и 3.1.2). Код PSHG осликавања парафинских пресека дошло је до мале промене у погледу примењене снаге ласера. Просечна снага ласера у равни узорка била је у опсегу од 13 до 21 mW. Из овога је процењено да је густина снаге на узорку 13,5 до 22 MW/cm².

3.3.3 Раманова спектроскопија и анализа

Раманови спектри колагена добијени су са истих парафинских пресека коже пацова који су се користили за снимање PSHG, са ласерским снопом фокусираним на колагена влакна. Експериментални услови били исти као у поглављу 3.2.3 и 3.2.4. Нискофреквентни спектрални опсег (700-1800) cm⁻¹ је изабран за анализу. Главна анализа компоненти (PCA) примењена је на колагенски спектар контролног ткива, дијабетичног ткива и након третмана L-аргинином. Вредности PCA анализе и усредњени Раманови спектри су коришћени за упоређивање обе подгрупе.

3.3.4 AFM анализа

Узорци депарафинисаних пресека коже анализирани су на AFM помоћу Molecular Imaging-Agilent PicoPlus AFM. За ова мерења коришћени су носачи од силицијум нитрида (MLCT-Bio, cantilever D, Bruker Company, Camarillo, CA, USA). Максимална примењена сила оптерећења је унапред подешена на 1,8 nN (Stylianou и сар., 2017). Мерења су извршена снимањем 5–10 различитих мапа сила величине 20×20 μm^2 (мрежа од 16×16 тачака) по узорку. Прикупљене мапе сила су анализирани помоћу AtomicJ (<https://sourceforge.net/projects/jrobust/>, accessed on 12 March 2024) (Hermanowicz и сар., 2014) како би се израчунао Јангов модул узорка помоћу Херцовог модела, постављањем Поасоновог односа на 0,5.

3.3.5 Осликавање узорака бојењем пикросиријус црвеним

Процена количине колагена у деловима ткива спроведена је бојењем пикросиријус црвеним (Sigma, Germany). Депарафинисани пресеци ткива су испрани дестилованом водом и бојени пикросиријус црвеним један сат на собној температури. Након тога,

пресеци су два пута испрани сирћетном киселином, два пута апсолутним етанолом и монтирани за хистолошку анализу. Као резултат, колагена влакна типа I, која су дебља, показују црвену (или наранџасту) боју, док колагена влакна типа III, која су тања, изгледају зелено или жуто (Stylianou и сар., 2021, 2022).

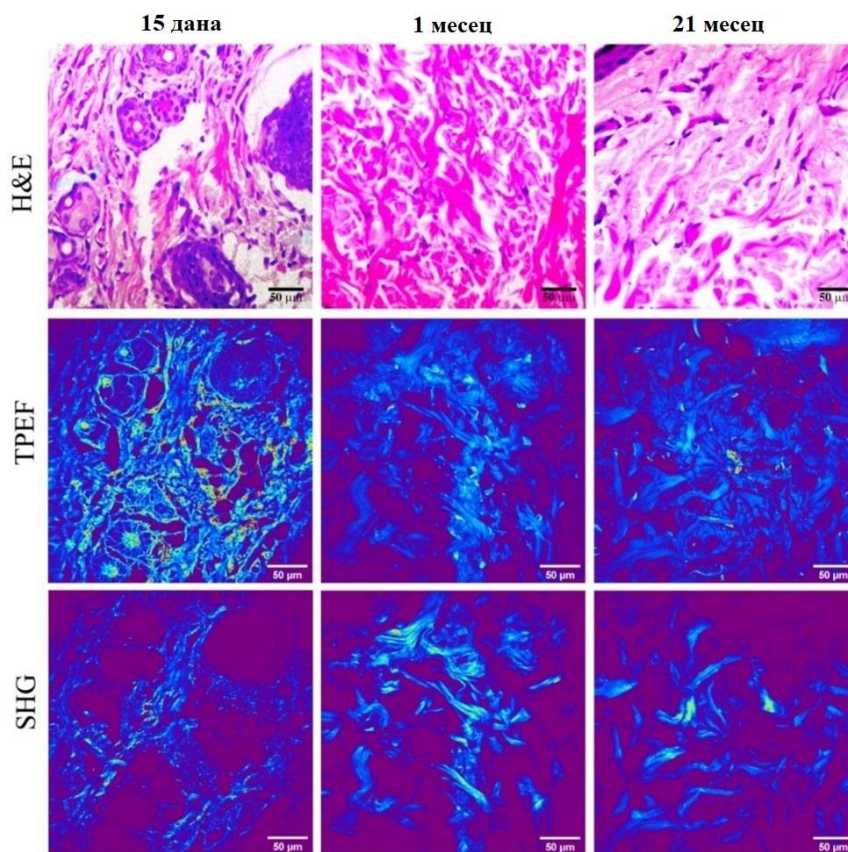
Слике делова обојеног ткива су снимане на увећању од 10x помоћу микроскопа Olympus BX53. Ове слике су добијене и без поларизатора и са линеарним поларизаторима (конкретно, U-POT поларизатором, U-ANT анализатором и U-KPA средњим прикључком, све из Olympus Corp., Токуо, Јапан). Слике истих услова бојења добијене су са идентичним подешавањима. Сви процеси снимања слика спроведени су дигитално користећи платформу за аквизицију cellSens са Olympus, Јапан.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Модел хронолошког старења дермиса пацова

4.1.1 Поређење светлосне са модалитетима мултифотонске микроскопије – TPEF и SHG

Исти регион од интереса (енг. Region of interest, ROI) са парафинских пресека дебљине 5 μm , рутински обојених H&E за конвенционалну светлосну микроскопију поређен је са модалитетима мултифотонске микроскопије – TPEF и SHG.



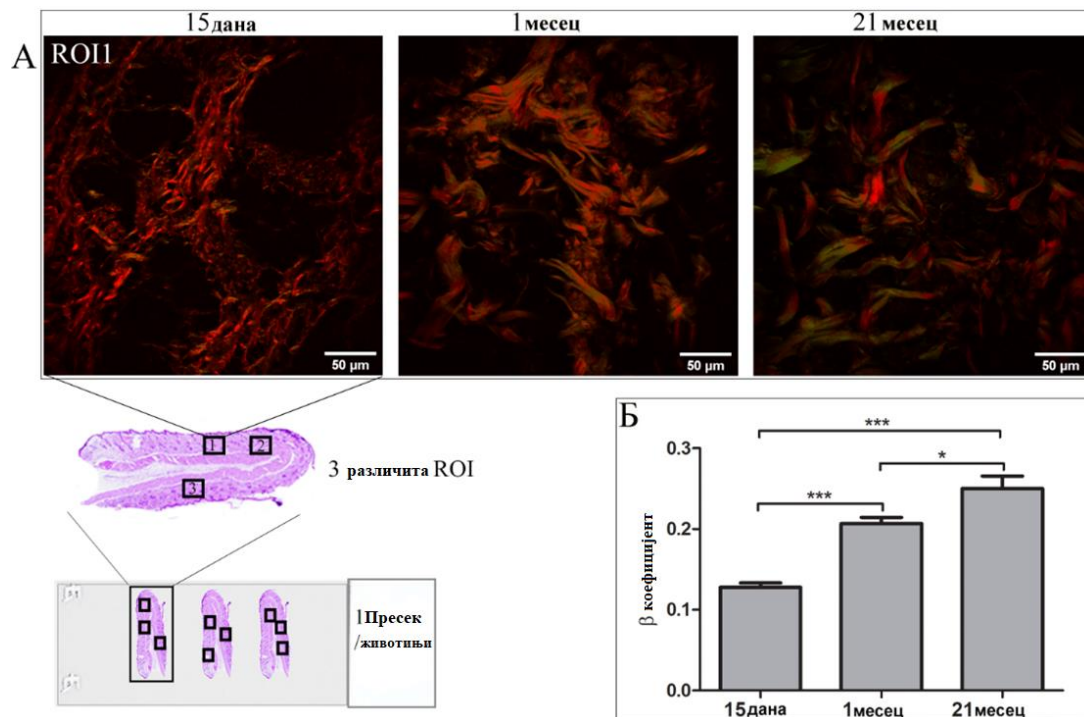
Слика 6. H&E бојење поређено са TPEF и SHG микроскопијом показује структуру и организацију дермалног колагена у кожи пацова старости 15 дана, 1 месец и 21 месец. TPEF и SHG - микроскопије потврђују резултате добијене светлосном микроскопијом без губитка информација о положају колагених влакана, густини и оријентацији. Парафински пресеци дебљине 5 μm ; бојење H&E; површина анализирана TPEF или SHG микроскопијом, Бар: 50 μm .

Светлосна микроскопија (Слика 6, H&E) коже пацова старих 15 дана је показала почетак синтезе ванћелијских компоненти и њихово организовање у матриксу дермиса. Уочавају се бројни фибробласти са интензивном синтезом проколагена, као и мали број колагених влакана у њиховој близини. Иако мање бројни, колагени фибрили већ показују специфично паковање и тенденцију да се организују у снопове, сугеришући да је овај

образац унапред одређен. Дермис пацова старих 1 месец показао је добро структуриран ванћелијски матрикс са компактним, добро организованим и оријентисаним колагеним сноповима. Међу сноповима колагена, бројни фибробласти су још увек присутни. У овој фази сазревања/старења коже, наши резултати су показали доследност у синтези, паковању и оријентацији колагених снопова у дермису пацова. У кожи пацова старих 21 месец, преовлађује велика количина чврсто упакованих и збијених, великих снопова колагена, док је број фибробласта значајно смањен. Компаративна анализа је такође показала да колаген дермиса пацова у свим испитаним групама даје јаке TPEF и SHG сигнале који одговарају светлосној микроскопији без губитка информација о положају, густини и оријентацији од колагених влакана.

4.1.2 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика

Структурне промене као и обрасце (начине) паковања колагених влакана, узрокованих старењем које нисмо могли видети светлосном микроскопијом, анализирали смо помоћу резултата добијених са PSHG слика – односно вредности β коефицијента (Слика 7). Снимљене су по две SHG слике за исто видно поље (Слика 7А) које се користе за обрачун β коефицијента (Слика 7Б). Једна за поларизацију SHG паралелну поларизацији ласера, а друга за поларизацију нормалну на поларизацију ласера.



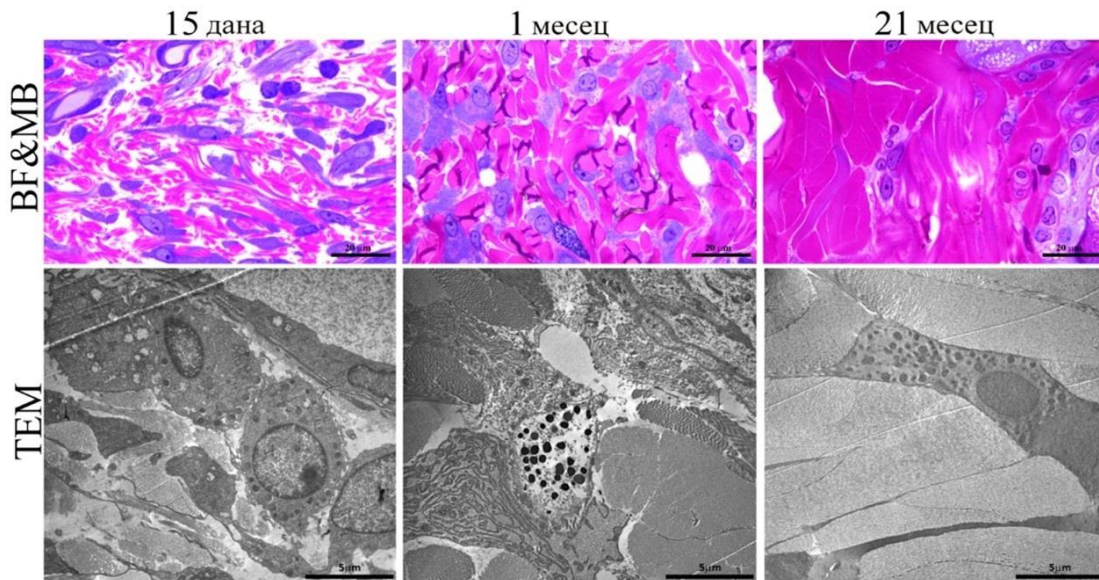
Слика 7. Репрезентативни ROI (А) за сваки узорак ткива који се користи за израчунавање β коефицијента са PSHG слика током хронолошког старења (пацови стари 15 дана, 1 месец и 21 месец). Интензитет на слици представља средњу вредност интензитета две SHG слике. (Б) Вредности представљају средњу вредност од девет β вредности по старосној групи, од укупно 27 ROI (3 ROI насумично одабрана из сваког од три различита парафинска пресека коже по пресеку \pm грешка средње вредности (енг. Standard Error of the Mean, SEM). * $p < 0,05$ и *** $p < 0,001$. Бар: 50 μm .

Са три серијска пресека (од једне животиње) за сваку испитивану групу (15 дана, 1 месец и 21 месец старости) су насумично одабрана три различита ROI за снимање. β коефицијент је израчунат по датој формули, за сваки пиксел у ROI. Просечна вредност β коефицијента је израчуната за сваки ROI (цела површина слике на Слици 7А). Резултати су анализирани користећи се β коефицијент израчунавањем и произвољно су категорисани као ниже, више, или високо уређене ултраструктуре.

Најниже β вредности су пронађене у кожи младих, пацова старости 15 дана, са просечном вредности 0,13. Ово је очекивано с обзиром да се млада коже налази у фази развоја коју карактерише интензивна синтеза колагена. Уређенија влакна су пронађена у кожи пацова старости 1 месец, која пролази кроз сазревање, са просечном вредношћу од 0,20. Кожа пацова старих 21 месец има највиши β коефицијент, са просечном вредношћу од 0,25, што указује на високу организацију колагених влакана, велику густину и чврсто паковање унутар колагених снопова. Да би проверили да ли су ови подаци у корелацији са резултатима са TPEF, додатно смо анализирали исте регионе коже на нивоу SM и TEM.

4.1.3 TEM анализа

Структуру и ултраструктуру дермиса смо упоредо анализирали светлосном и електронском микроскопијом. За светлосну микроскопију смо користили полутанке пресеке двојно бојене BF&MB (Слика 8).

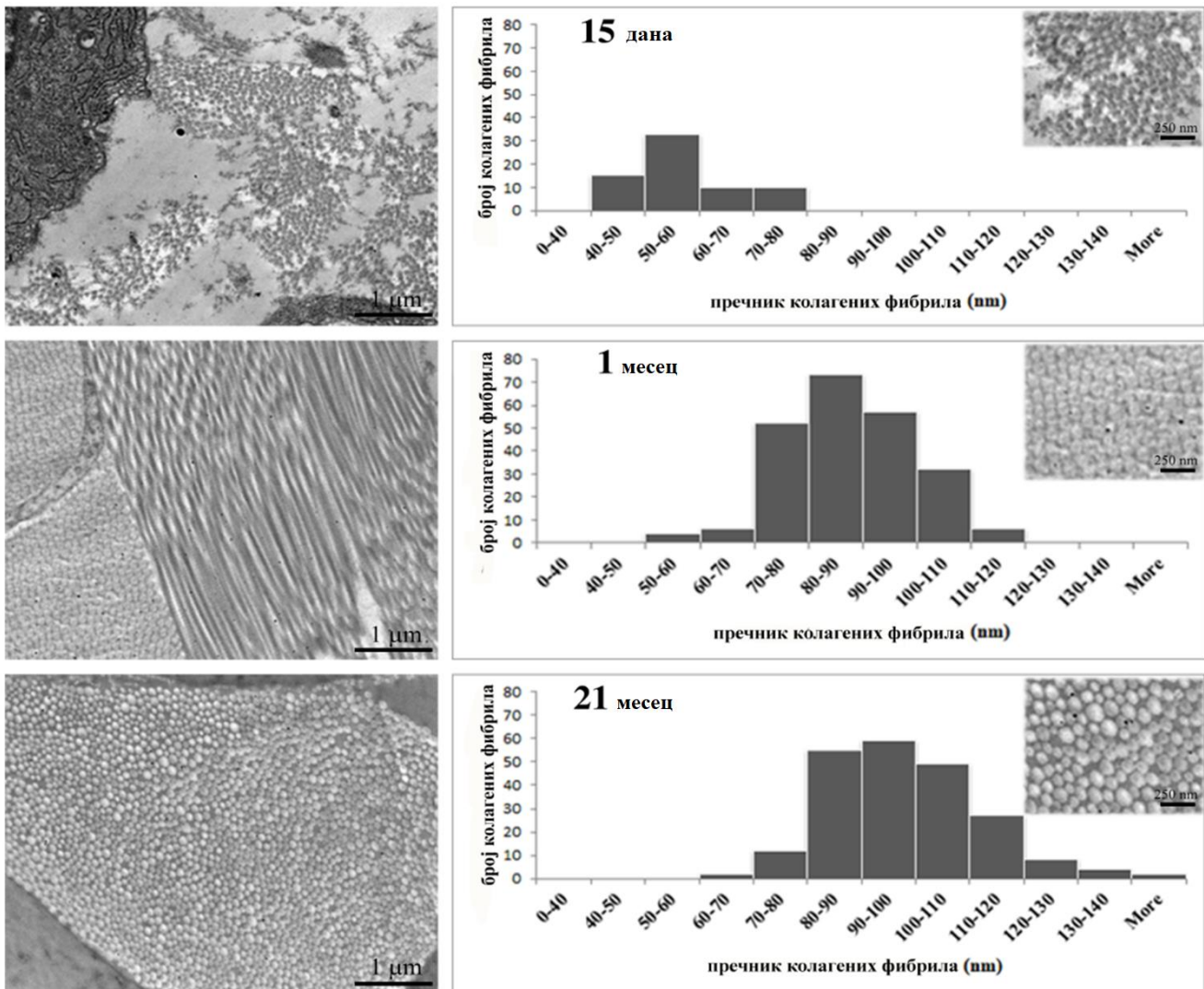


Слика 8. BF&MB бојење полутанких пресека показује подручје анализирано на нивоу TEM. Уочљива је разлика у изгледу фибробласта и колагена. Бар: BF&MB-20 μm ; TEM-5 μm .

Резултати су потврдили ткивну доследност у структури колагена, густинама снопова и количини основне супстанце ванћелијског матрикса. Фина ултраструктурна анализа додатно је показала изглед и синтетску форму фибробласта, органеле које учествују у синтези, као и број и густину колагених влакана. Мерењем пречника колагених

фибрила у насумично одабраним пресецима влакана свих испитаних група упоредили смо њихову дистрибуцију (Слика 9). Добијени резултати показују упадљиву разлику између младе (15 дана старе), зреле (1 месец старе) и остареле (21 месец) коже пацова. Наиме, већина пресека фибрила унутар колагенских влакана код дермиса пацова старог 15 дана имали су просечне дијаметре у распону од 50 до 60 nm, заједно са сличним бројем пречника у распону од 40 до 50, и 60 до 80 nm. Ово је у складу са чињеницом да се у младој кожи активно синтетише колаген што потврђују и анализа на ултраструктурном нивоу. Колагена влакна је тешко квантификовати због велике количине основне супстанце у коју су местимично уроњена танка (незрела) колагена влакна дајући дермису „растресит“ изглед (Слика 8, VF&MB и TEM).

ТЕМ

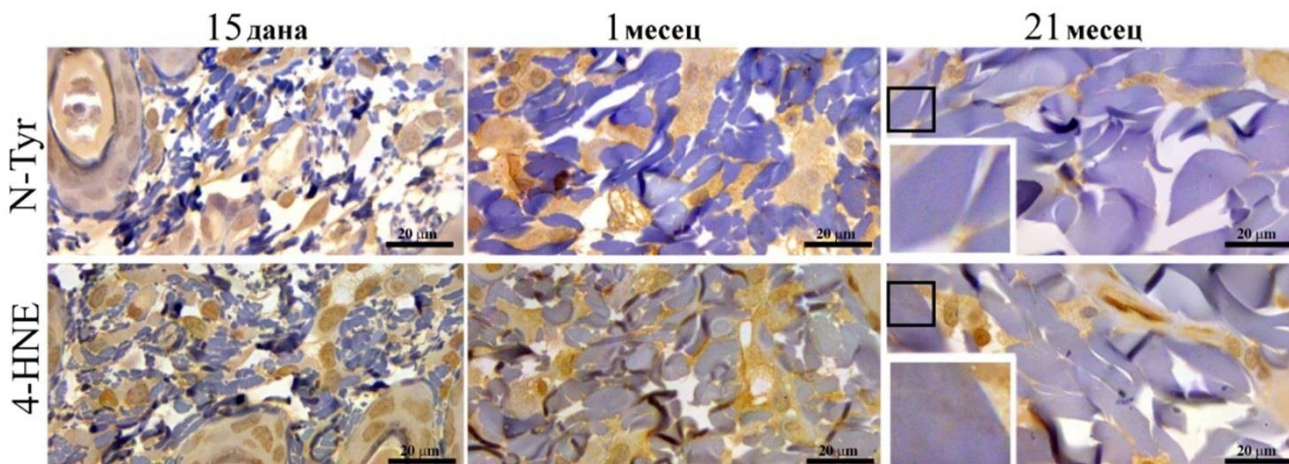


Слика 9. Структурна промена и дистрибуција пречника колагених влакана у дермису пацова старих 15 дана, 1 месеца и 21 месец. Старење изазива пораст пречника колагених влакана као и чврсто паковање молекула колагена што доводи до организације колагена у снопове и ригидности дермиса. Бар: TEM-1 μm ; инсет-250 nm.

Насупрот томе, дермис зрелих и старих пацова је имао просечну вредност пресека колагених фибрила од 80 до 90 nm (1-месечни) и 90 до 100 nm (21-месечни). Поред чињенице да је јасно повећање у величини попречног пречника фибрила последица природног сазревања коже, важно је указати на одсуство колагена са пречником од 50 до 60 nm, као и прелаз ка вишим вредностима (>120 nm). На ултраструктурном нивоу, иако су снопови колагена у дермису старих пацова били велики и чврсто упаковани, као и код пацова са зрелом кожом, они се уочавају као дебљи, набубрели и доста светлији, сугеришући оштећења, што све може довести до чврстог и густог паковања молекула колагена.

4.1.4 Имунохистохемијска детекција 4-HNE и N-Тур

С обзром на запажена оштећења колагена даље смо анализирали биомаркере оксидативног оштећења, и то N-Тур и 4-HNE који су показани и као биомаркери старења. Наши резултати су показали присуство 4-HNE и N-Тур модификације колагених влакана у дермису пацова старости 21 месец (Слика 10).



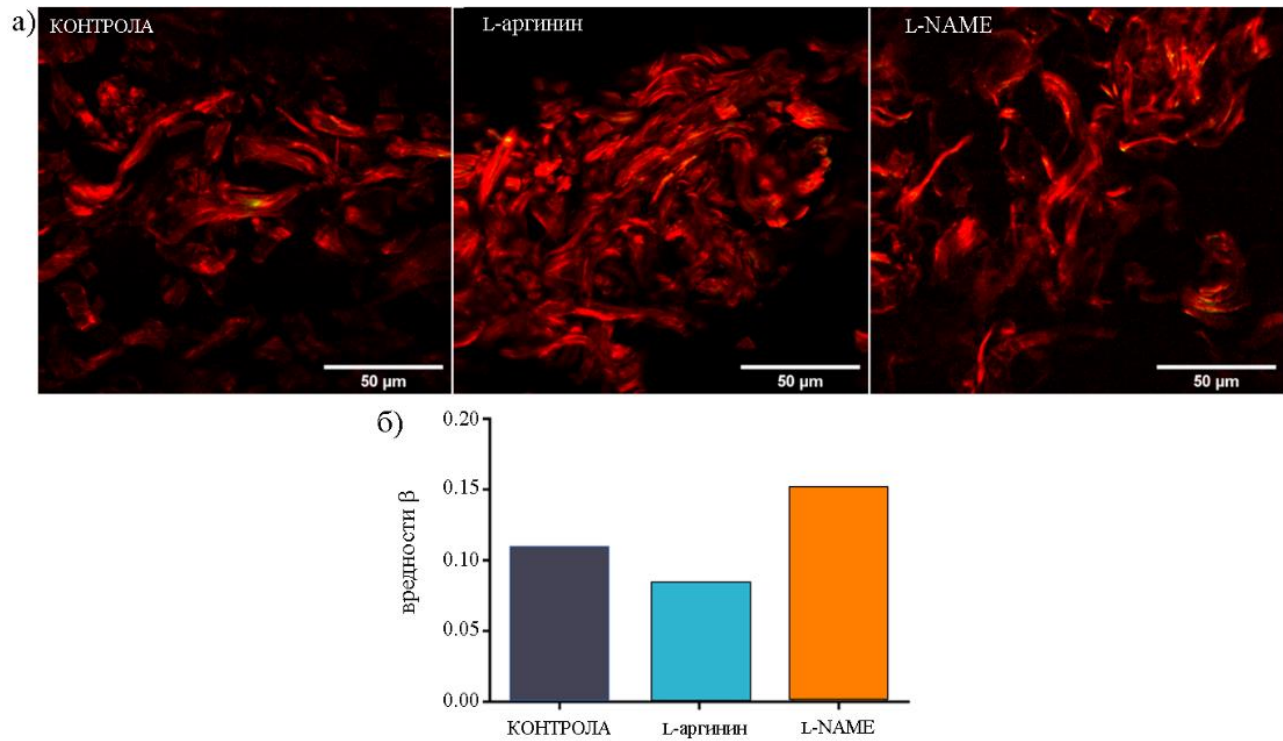
Слика 10. Имунохистохемијска детекција 4-HNE и N-Тур—биомаркера оксидативног оштећења ткива. Инсети представљају увећани део слике (црни квадрат): Колаген (плаво) је показао имунопозитивност за 4-HNE и N-Тур (браон) само код пацова старих 21 месец. Бар: 20 µm.

4.2 Модел ремоделирања дермиса пацова третманом L-аргинином

4.2.1 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика

Резултати добијени са PSHG слика – β коефицијент, са парафинских пресека, су нам помогли при анализи образаца паковања (структурирања) колагена и 3D организације након третмана L-аргинином и L-NAME (Слика 11). У поређењу са контролом (просечна

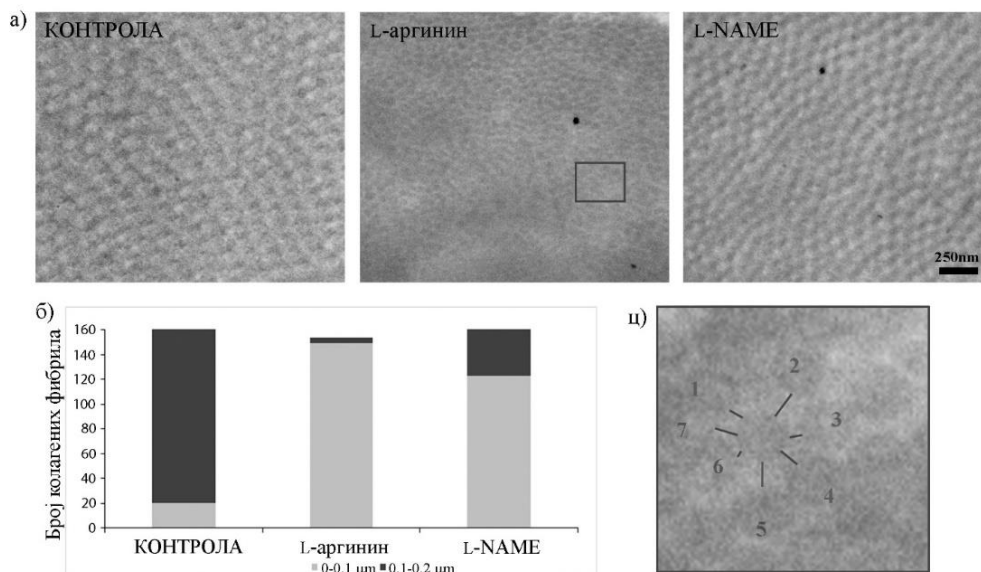
вредност 0,11, тачније средња вредност β за цео ROI), третман L-аргинином са просечном вредношћу од 0,08, померио је β вредности ка нижим, док је третман L-NAME вредности β коефицијента померио ка вишим вредностима и самим тим ка већој уређености образаца паковања (просечна вредност коефицијента 0,15). Овај резултат несумњиво доказује антагонистичко деловање третмана, и указује на чињеницу да ова два третмана треба пажљиво комбиновати да би се избегло нарушавање равнотеже у циљу постизања жељних резултата.



Слика 11. (а) PSHG слике дермалног колагена пацова контролне групе, групе третиране L-аргинином и L-NAME и (б) израчунате β вредности третираних група. Интензитет на слици представља средњу вредност интензитета две SHG слике. Бар: 50 μ m.

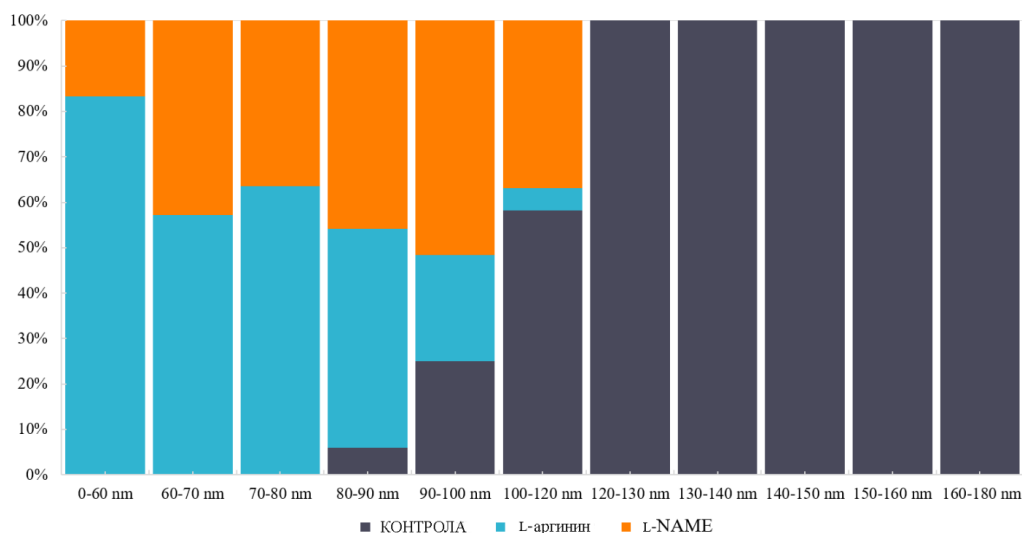
4.2.2 TEM анализа

Исту дермалну област смо искористили за анализу структуре и организације колагених влакана трансмисионом електронском микроскопијом и измерили попречне пресеке фибрила у одабраним пресецима унутар колагених снопова (влакана) (Слика 12).



Слика 12. Репрезентативни примери слика ултраструктуре колагених влакана (а) и дистрибуције пречника колагена (б) контролне групе, групе пацова третираних L-аргинином и групе са L-NAME третманом. Поред колагених фибрила мањих пречника након третмана L-аргинином, њихова организација је лабавија (ц) слика је увећани детаљ из (а). Удаљеност између фибрила (црне линије); суседни фибрили (1-7). Бар: 250 nm.

Просечна вредност попречних пресека колагених фибрила контролног дермиса била је око 120 nm. У поређењу са контролом већина колагенских фибрила након третмана L-аргинином, имала је просечне пречнике од 80 nm. Добијени резултати су у складу са смањењем вредности β коефицијента, израчунатог након третмана L-аргинином. Међутим, широка дистрибуција пречника фибрила (Слика 13) показује веома мали број зрелих влакана (Слика 12б) као и посматрани простор између влакана (Слика 12ц), сугерише на дубље конформационе промене самог молекула колагена.



Слика 13. Расподела пречника фибрила код контролних пацова, пацова третираних L-аргинином и L-NAME.

4.2.3 Анализа Рамановом спектроскопијом

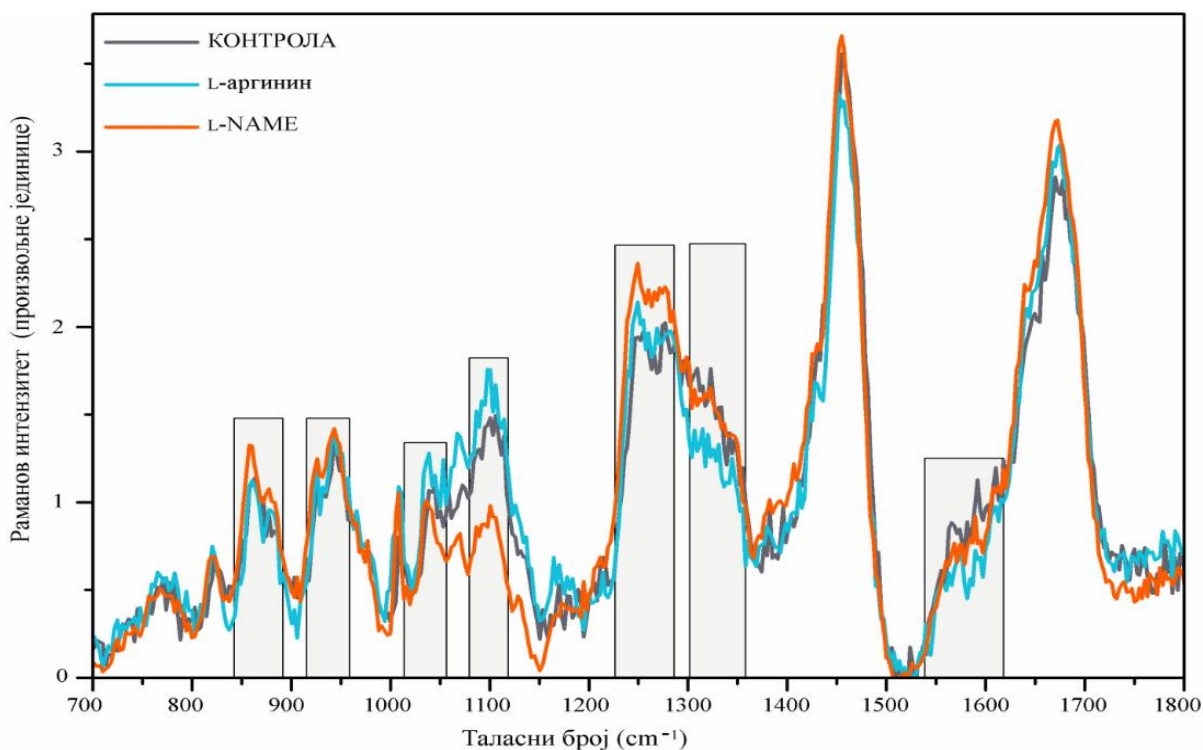
У табели 1 су наведене позиције модова у Рамановом спектру колагена у дермису пацова и промене њихових интензитета узроковане третманом L-аргинином или L-NAME. Асигнације вибрационих модова уочених у Рамановом спектру дермалног колагена пацова (Слике 14 и 15) додељене су коришћењем података из литературе (референце наведене у Табели 1).

Табела 1. Положаји Раманових модова колагена за спектрални регион 700-1800 cm^{-1}

Позиција	Асигнација	Третман & Интезитет/смер промене	Референце
765 cm^{-1}	COO- Деформација	L-аргинин ↑	Van Gulick и сар., (2019) ; Prokopi и сар., (2021)
820 cm^{-1}	C-C истезање пролина и хидроксипролина	L-аргинин ↑	Movasaghi и сар., (2007)
837 cm^{-1}	Савијање тирозина ван равни	L-аргинин ↓	Contorno и сар., (2021)
858 cm^{-1}	C-C истезање прстена пролина и хидроксипролина Вибрације бочних ланаца пролина и хидроксипролина C-C вибрације молекулског скелета колагена Вибрација прстена тирозина	L-NAME ↑	Stone и сар., (2004); Cheng и сар., (2005); Cárcamo и сар., (2012); Martinez и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019); Prokopi и сар., (2021)
874 cm^{-1}	C-C истезање прстена хидроксипролина	L-NAME ↑ L-аргинин ↑	Movasaghi и сар., (2007); Nguyen и сар., (2012); Van Gulick и сар., (2019); Prokopi и сар., (2021)
926 cm^{-1}	C-C истезање прстена пролина и хидроксипролина C-C истезање молекулског скелета колагена	L-аргинин ↑ L-NAME ↑	Movasaghi и сар., (2007); Nguyen и сар., (2012) ; Martinez и сар., (2019)
943 cm^{-1}	C-C истезање пролина и хидроксипролина C-C истезање молекулског скелета колагена	L-NAME ↑	Cárcamo и сар., (2012); Van Gulick и сар., (2019); Prokopi и сар., (2021)
970-980 cm^{-1}	C-C истезање молекулског скелета колагена	L-NAME ↑ L-аргинин ↑	Movasaghi и сар., (2007)
1010 cm^{-1}	Угаоно истезање фенилног прстена у фенилаланину	L-аргинин ↑ L-NAME ↑ *Померање на нижу фреквенцију - 1007 cm^{-1}	Cheng и сар., (2005); Contorno и сар., (2021)

1041 cm ⁻¹	C-N у равни савијање фенилаланина	L-аргинин ↑ L-NAME ↑ *Померање на нижу фреквенцију - 1037 cm ⁻¹	Cheng и сар., (2005); Su и сар., (2019)
1100 cm ⁻¹	NCH деформација у пролину	L-аргинин ↑ L-NAME ↓	Cárcamo и сар., (2012); Van Gulick и сар., (2019)
1054 cm ⁻¹	C-O истезање колагена	L-аргинин ↑	Movasaghi и сар., (2007)
1067 cm ⁻¹	C-N истезање пролина	L-аргинин ↑	Cárcamo и сар., (2012)
1165 cm ⁻¹	Тирозин (C-N савијање прстена у равни)	L-аргинин ↑	Cheng и сар., (2005)
1214 cm ⁻¹	Амид III (купловање C-N истезања и N-N везивања, може бити помешано са вибрацијама бочних ланаца) Тирозин	L-аргинин ↓ L-NAME ↑	Movasaghi и сар., (2007); Hernández и сар., (2016)
1250 cm ⁻¹	Амид III (C-N истезање амидних веза)	L-аргинин ↑ L-NAME ↑↑	Cárcamo и сар., (2012); Martinez и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019); Prokopi и сар., (2021)
1270 cm ⁻¹	Амид III	L-аргинин ↑ L-NAME ↑↑	Movasaghi и сар., (2007); Su и сар., (2019)
1300-1350 cm ⁻¹	CH₃CH₂ деформације колагена	L-аргинин ↓	Movasaghi и сар., (2007); Martinez и сар., (2019)
1396 cm ⁻¹	Савијање метил група	L-аргинин ↑ L-NAME ↑	Movasaghi и сар., (2007)
1454 cm ⁻¹	CH₂ истезање/ CH₃ асиметрична деформација Преклапање асиметричне CH₃ савијајуће и CH₂ маказасте деформације CH₂ савијајућа деформација колагена	L-аргинин ↓	Lau и сар., (2003); Su и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019)
1580-1620 cm ⁻¹	Фенилаланин/ Тирозин вибрације истезања	L-аргинин ↓ L-NAME ↓	Movasaghi и сар., (2007)
1640 cm ⁻¹	Амид I	L-аргинин ↑ L-NAME ↑	Movasaghi и сар., (2007)
1670 cm ⁻¹	Амид I	L-аргинин ↑ L-NAME ↑	Movasaghi и сар., (2007)

Аминокиселине пролин и хидроксипролин заједно са амидима представљају три главне компоненте које су укључене у конформационе промене структуре колагена (Martinez и сар., 2019).



Слика 14. Усредњени Раманови спектри дермалног колагена, контролних пацова, третираних L-аргинином и L-NAME. Најинтензивније промене спектра су истакнуте светлосивим правоугаонцима.

У складу с тим показали смо неколико истакнутих Раманових пикова који одговарају аминокиселинама пролин и хидроксипролин. Позиције на 820 cm^{-1} , 874 cm^{-1} , 926 cm^{-1} и 943 cm^{-1} одговарају C-C истезањима пролинског и хидроксипролинског прстена. У поређењу са контролом, интензитети ових пикова су већи за групе третиране L-аргинином и L-NAME.

Пик на 858 cm^{-1} осим истезања пролинског прстена такође има асигнацију вибрације тирозина (Movasaghi и сар., 2007; Contorno и сар., 2021), тако да се не може недвосмислено тумачити.

Према налазима Cárcamo и сар., (2012), пролин има још две важне Раманове траке, једну широку, са пиком на 1100 cm^{-1} који се приписује N-C-H деформацији, а друга на 1067 cm^{-1} са асигнацијом C-N истезање пролина. На оба пика се уочава повећан интензитет након третмана L-аргинином, који заједно са горе наведеним понашањем пролинског прстена сугерише количински већи садржај пролина, као резултат директног утицаја на регенерацију пролина (преко пролинског пута).

Такође, смо пронашли промене код модова ароматичних аминокиселина – фенилаланина и тирозина. Анализирани Раманови модови одговарају положајима на 837 cm^{-1} , 858 cm^{-1} , 1010 cm^{-1} , 1041 cm^{-1} и 1165 cm^{-1} .

Фенилаланин има два карактеристична Раманова мода: прва је на 1010 cm^{-1} која одговара савијању фенил прстена (тј. деформацији) (Stone и сар., 2004; Cheng и сар., 2005),

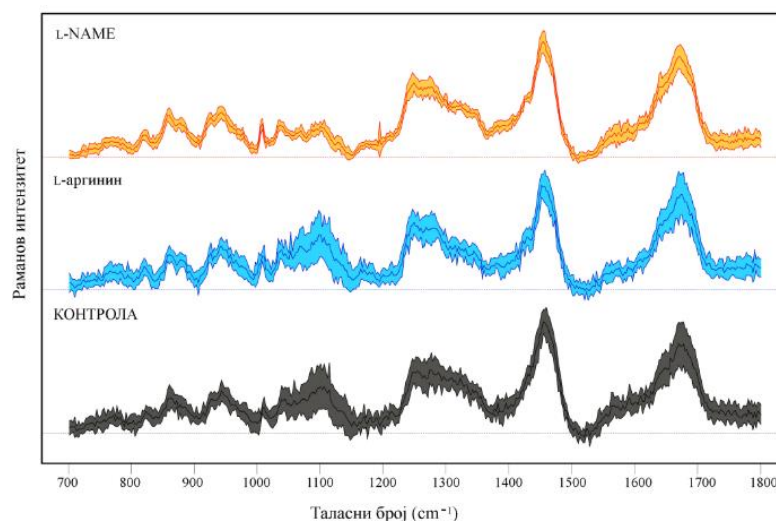
друга је на 1041 cm^{-1} која одговара C-H савијању у равни прстена (Stone и сар., 2004; Nguyen и сар., 2012). Након оба третмана, и L-аргинином и L-NAME, њихове позиције се померају ка нижим фреквенцијама а интензитет им се повећава.

Раманов спектар тирозина карактеришу пикови на 837 cm^{-1} , 858 cm^{-1} и 1165 cm^{-1} . Према Contorno и сар., (2021), мод на 837 cm^{-1} одговара савијању изван равни прстена, и његов интензитет опада након третмана L-аргинином. Пик на 858 cm^{-1} одговара вибрацијама тирозина у равни прстена, али и пролинском моду (Su и сар., 2019) док 1165 cm^{-1} одговара тирозинском C-H (Nguyen и сар., 2012), савијању у равни прстена и интензитет све три позиције се повећава након третмана L-аргинином. Штавише, имунохистохемијско бојење нитротирозином показало је додатну модификацију тирозина у колагену због производње азотног оксида из L-аргинина (Слика 16).

Амид III траке се примећују на $\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ и $\sim 1270\text{ cm}^{-1}$, а амид I траке на $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ и $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$. Мод на 1215 cm^{-1} може потицати од вибрација амида III, али исто тако може бити и тирозинског порекла, те из тог разлога није анализиран. Амид III и амид I тракама се након L-аргинин и L-NAME третмана, повећава интензитет.

Деформације CH_3/CH_2 су се одразиле у неколико модова у региону $(1300-1350)\text{ cm}^{-1}$ и у пику на 1454 cm^{-1} . Након третмана L-аргинином, интензитети наведених модова су се смањили, као резултат промена у конформацији повезаних са молекуларном реоријентацијом. Због различитих асигнација приписаних позицији на 1454 cm^{-1} није могуће прецизно интерпретирати овај мод, али је очигледно да су неке CH_3/CH_2 деформационе вибрације укључене.

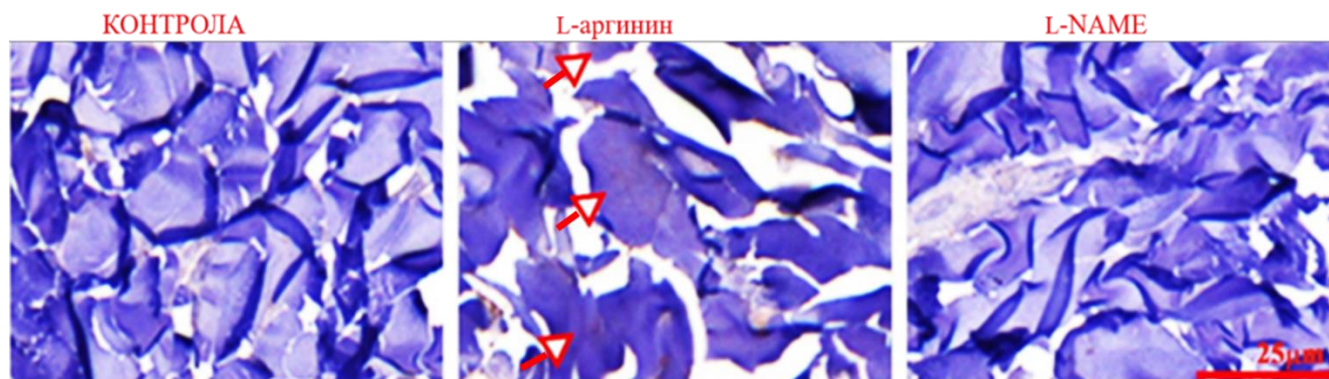
На повећање садржаја пролина/хидроксипролина указују вибрације истезања молекуларног костура колагена на позицијама 926 cm^{-1} , 943 cm^{-1} , $970-980\text{ cm}^{-1}$ и 1054 cm^{-1} , као и деформација COO^- на 765 cm^{-1} и C-N пролинско истезање на 1067 cm^{-1} .



Слика 15. Раманови спектри дермалног колагена контролних пацова, пацова третираних L-аргинином и L-NAME, представљени су као средња вредност \pm стандардна девијација (SD).

4.2.4 Имунохистохемијска детекција N-Тур

С обзиром на запажену интензивну синтезу колагена и промене тирозина уочене Рамановом спектроскопијом, даље смо анализирали молекулски основ деловања L-аргинина. Имунохистохемијско бојење на N-Тур показало је да синтеза азот-монооксида изазвана третманом L-аргинином доводи до нитрације тирозина, која је заустављена L-NAME третманом (Слика 16).

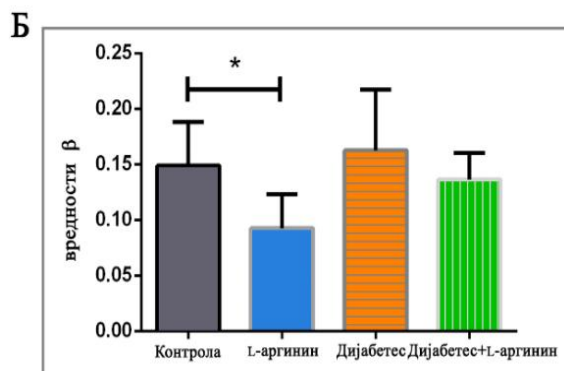
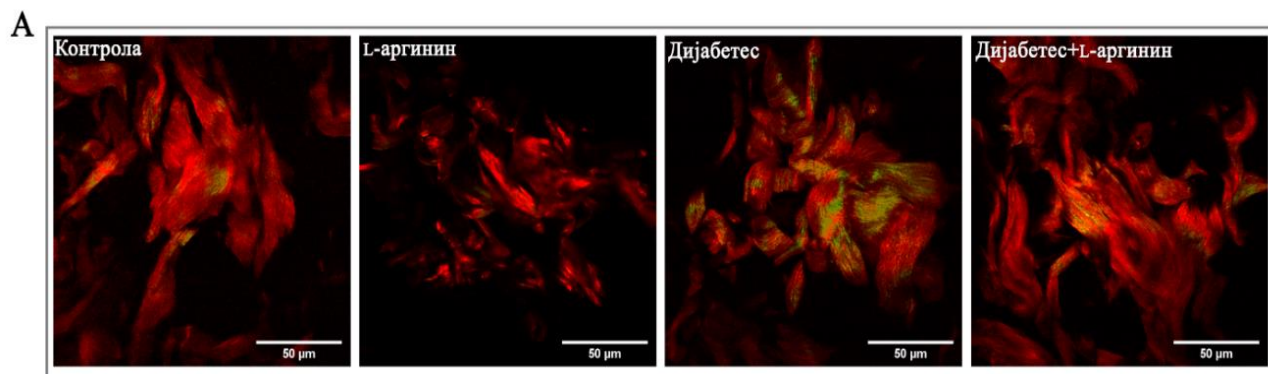


Слика 16. Репрезентативне слике имунохистохемијског бојења N-Тур колагена дермиса пацова. Третман L-аргинином изазива већу имунопозитивност (браон, црвене стрелице) колагених фибрила (плаво). Бар: 25 μm .

4.3 Модел експериментално изазваног дијабетеса типа 1 и третмана L-аргинином

4.3.1 Резултати β коефицијената добијених са PSHG слика

Користили смо резултате добијене са PSHG слика, односно β коефицијент за анализу финих структурних промена, образаца паковања и 3D организације колагена у кожи пацова током дијабетеса изазваног алоксаном и ефеката краткотрајног третмана L-аргинином на дијабетичну кожу. Као и у нашим претходним експериментима, анализирали смо по три животиње за сваку изабрану групу (контролна група, група третирана L-аргинином, група пацова са дијабетесом и пацови са дијабетесом третирани L-аргинином). Три различита ROI са сваког пресека су насумично одабрана за снимање. Резултати анализирани након израчунавања β коефицијената су категорисани као ниже, више или високо уређене структуре.



Слика 17. А) PSHG слике дермалног колагена. Интензитет на слици представља средњу вредност интензитета две SHG слике. Б) Израчунате β вредности. Вредности представљају средњу вредност \pm SEM, за сваку тачку $n=27$, $*p<0,05$. Бар: 50 μm .

У овом моделу, контролне и дијабетичне групе имају сличан β коефицијент (0,16 наспрам 0,15 у контролној групи, Слика 17Б), са тенденцијом ка вишим вредностима, вероватно због неједнаких, неуниформних образаца промене колагена (области са уређенијим и мање уређеним колагеним сноповима), што указује на неуједначено оштећење колагена дуж влакана (Слика 17А). Третман L-аргинином групе са дијабетесом, иако релативно кратак (7 дана), снижио је вредност β коефицијента у поређењу са дијабетичном групом која није имала третман, што указује на потенцијал L-аргинина да ублажи или успори ефекте дијабетеса на колаген коже. Тако, L-аргинин би се могао користити као третман у предијабетичним стањима и дијабетесу у раној фази болести.

4.3.2 Анализа Рамановом спектроскопијом

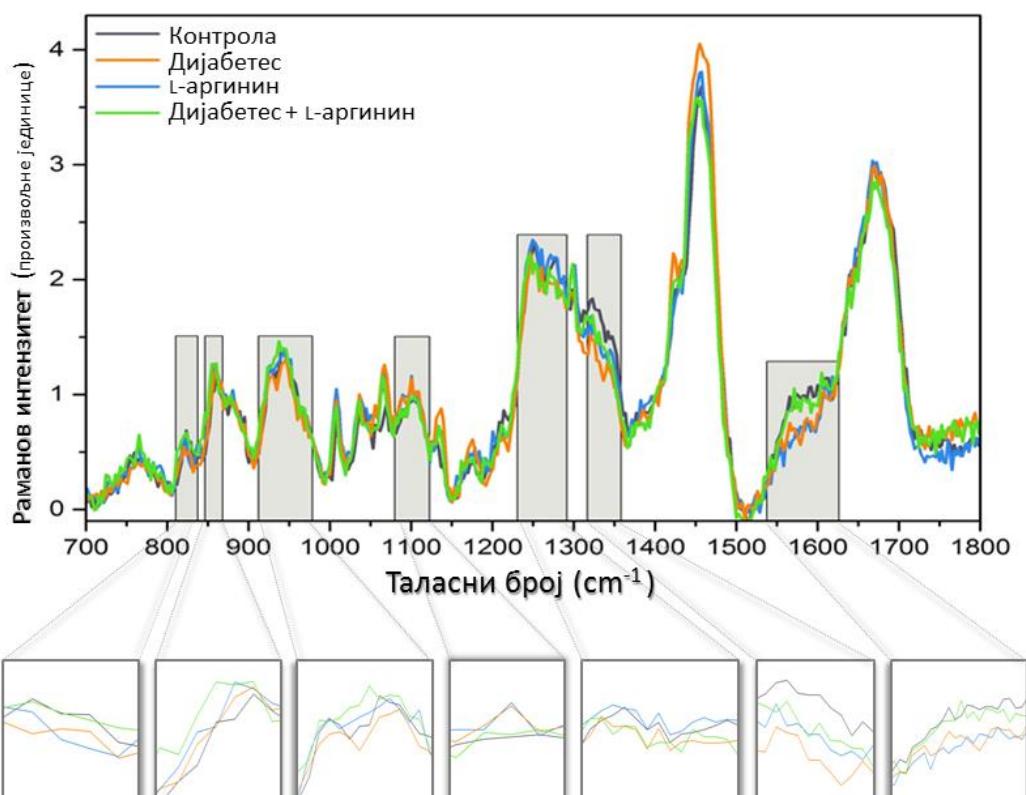
Структурне и биохемијске промене колагена дермиса пацова код дијабетеса изазваног алоксаном и ефекта 7-дневног третмана L-аргинином смо анализирали Рамановом спектроскопијом. Резултати су представљени на сликама 18 и 19, које показују усредњене спектре четири групе узорака. Добијени резултати су засновани на експерименталним и теоријским подацима о Рамановим спектрима колагена и протеина уопште, који се могу наћи у литератури (Табела 2). Резултати су добијени комбиновањем РСА анализе и анализе усредњених спектра.

Табела 2. Положаји Раманових модова колагена за спектрални регион 700-1800 cm^{-1}

Позиција	Асигнација	Референце
823 cm^{-1}	С-С истезање скелета колагена	Cárcamo и сар., (2012)
831 cm^{-1}	С-Н тирозина (померање групе ван равни)	Stone и сар., (2004); Hernández и сар., (2016)
858 cm^{-1}	Пролин, хидроксипролин (С-С истезање, вибрације бочних ланаца), Тирозин, С-С истезање скелета колагена	Stone и сар., (2004); Cheng и сар., (2005); Cárcamo и сар., (2012); Martinez и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019); Prokopi и сар., (2021)
917 cm^{-1}	С-С истезање пролина	Nguyen и сар., (2012); Martinez и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019)
934/937 cm^{-1}	С-С истезање скелета колагена	Cheng и сар., (2005); Nguyen и сар., (2012); Martinez и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019); Contorno и сар., (2021); Prokopi и сар., (2021)
951 cm^{-1}	Тирозин (вибрације ван равни)	Joodaki и сар., (2019)
1008 cm^{-1}	Фенилаланин	Cárcamo и сар., (2012); Van Gulick и сар., (2019)
1035 cm^{-1}	С-Н истезање у пролину С-Н у савијање у равни фенилаланина	Stone и сар., (2004); Cárcamo и сар., (2012)
1067 cm^{-1}	С-Н истезање у пролину	Cárcamo и сар., (2012)
1100 cm^{-1}	Деформација N-C-H у пролину	Stone и сар., (2004); Cárcamo и сар., (2012); Van Gulick и сар., (2019)
1249 cm^{-1}	Амид III (С-Н истезање амидних веза)	Cárcamo и сар., (2012); Martinez и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019); Prokopi и сар., (2021)
1276 cm^{-1}	Амид III	Movasaghi и сар., (2007); Martinez и сар., (2019); Su и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019)

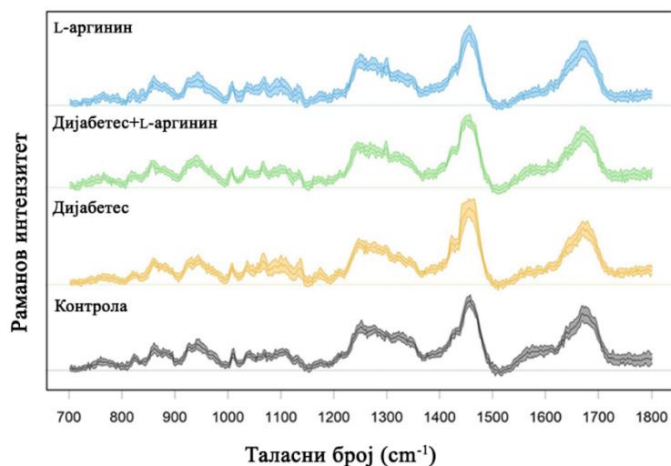
1314 cm ⁻¹	CH ₃ CH ₂ увртање колагена	Movasaghi и сар., (2007)
1320 cm ⁻¹	CH ₃ CH ₂ деформације колагена	Martinez и сар., (2019); Su и сар., (2019); Van Gulick и сар., (2019)
1336 cm ⁻¹	CH ₃ CH ₂ машуће/CH ₂ маказасте деформације колагена	Stone и сар., (2004); Martinez и сар., (2019)
1445 cm ⁻¹	CH ₃ CH ₂ деформације колагена CH ₂ савијајуће и маказасте вибрације колагена	Movasaghi и сар., (2007)
1465 cm ⁻¹	CH ₂ /CH ₃ деформација колагена CH ₂ машућа деформација	Movasaghi и сар., (2007)
1544 cm ⁻¹	Амид II	Movasaghi и сар., (2007); Anastassopoulou и сар., (2019)
1557 cm ⁻¹	Амид II (C-N истегање и N-H деформација)	Movasaghi и сар., (2007)
1594 cm ⁻¹	Фенилаланин	Movasaghi и сар., (2007); Hernández и сар., (2013)
1644 cm ⁻¹	Амид I	Movasaghi и сар., (2007)
1665 cm ⁻¹	Амид I	Movasaghi и сар., (2007); Nguyen и сар., (2012); Van Gulick и сар., (2019)
1680 cm ⁻¹	Амид I	Movasaghi и сар., (2007)
1700 cm ⁻¹	Амид I	Movasaghi и сар., (2007); Martinez и сар., (2019)

Истакнути Раманови модови повезани са компонентама колагена налазе се на 823 cm⁻¹, 828 cm⁻¹, 858 cm⁻¹, 917 cm⁻¹, 934 cm⁻¹, 1249 cm⁻¹, 1276 cm⁻¹, 1336 cm⁻¹, 1544 cm⁻¹, 1557 cm⁻¹ и 1594 cm⁻¹. Интензитети прве групе модова на 1336 cm⁻¹, 1544 cm⁻¹, 1557 cm⁻¹ и 1594 cm⁻¹ су највећи у контролној групи и групи са дијабетесом третираној L-аргинином, док опадају у групи са дијабетесом и најнижи су у групи третираној L-аргинином. За другу групу модова, која се налази на 823 cm⁻¹, 831 cm⁻¹, 858 cm⁻¹, 917 cm⁻¹, 934 cm⁻¹, 1249 cm⁻¹ и 1276 cm⁻¹, ситуација је мало другачија. Њихов интензитет је највећи у групи третираној L-аргинином, нижи у контролној групи, нешто нижи у групи са дијабетесом третираној L-аргинином и најнижи у групи са дијабетесом.



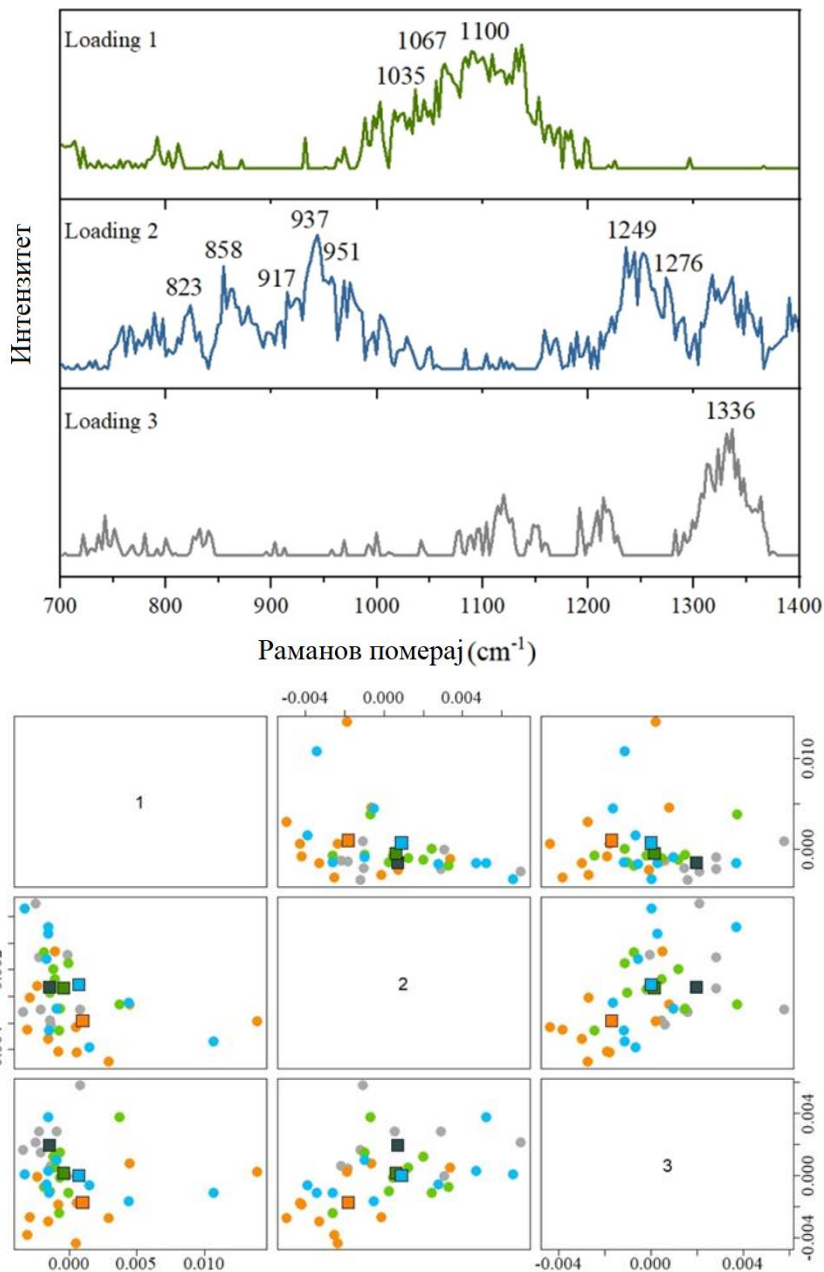
Слика 18. Усредњени Раманови спектри дермалног колагена у испитаним експерименталним групама. Светлосиве истакнуте области су увећане и представљају најинтензивније промене описане у табели 2.

Промене уочене у Рамановом спектру указују на то да третман са L-аргинином умањује ефекте дијабетеса на колаген у кожи. Већина промена у Рамановим спектрима које се јављају у дијабетичној кожи се анулирају након третмана са L-аргинином, на основу резултата да су спектри дијабетичне групе третиране са L-аргинином веома слични спектрима контролног узорка.

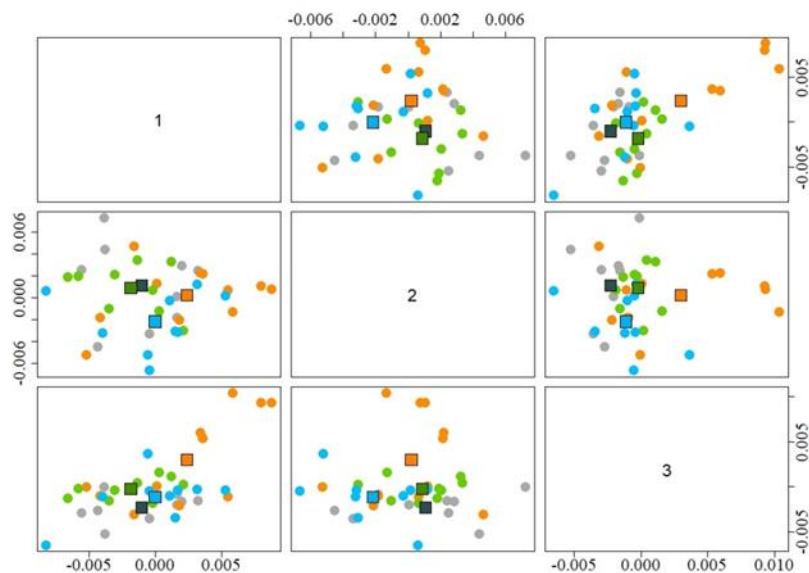
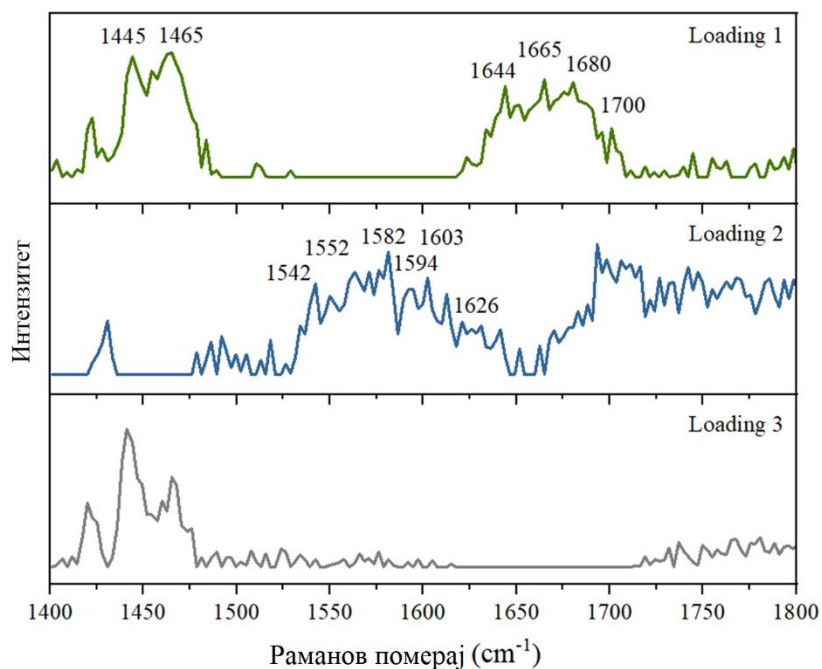


Слика 19. Раманови спектри дермалног колагена у испитиваним експерименталним групама, представљени као средња вредност \pm SD.

Ненегативна PCA анализа обављена је у два интервала: (700-1400) cm^{-1} и (1400-1800) cm^{-1} посебно зато што су истакнути пикови у последњем интервалу неколико пута интензивнији од већине пикова у првом интервалу. Прва три вектора оптерећења („loadings“) и њихови одговарајући графикони PCA скорова за оба интервала приказана су на слици 20 и 21.



Слика 20. У горњем панелу су представљени PCA вектори оптерећења 1-3, а на доњем панелу графикони парова скорова за интервал (700-1400) cm^{-1} . Кругови представљају вредности резултата за сваки спектар из експерименталних група: контрола (тамно сива), дијабетес (наранџаста), L-аргинин (небеско плава) и дијабетес+L-аргинин (зелена). Средње вредности резултата за сваку групу представљају квадрати и обојени су као група којој одговарају.



Слика 21. У горњем панелу су представљени PCA вектори 1-3 а на доњем панелу графикони парова скорова за интервал (1400-1800) cm^{-1} . Кругови представљају вредности резултата за сваки спектар из експерименталних група: контрола (тамно сива), дијабетес (наранџаста), L-аргинин (небеско плава) и дијабетес+L-аргинин (зелена). Средње вредности резултата за сваку групу представљају квадрати и обојени су као група којој одговарају.

Први вектор оптерећења на слици 20 показује широк врх са неколико суперпонираних пикова у интервалу (1000-1200) cm^{-1} . Са графикана скорова за прву компоненту можемо видети да интензитет приказаних пикова вектора оптерећења расте следећим редоследом: контрола < дијабетес+L-аргинин < L-аргинин < дијабетес.

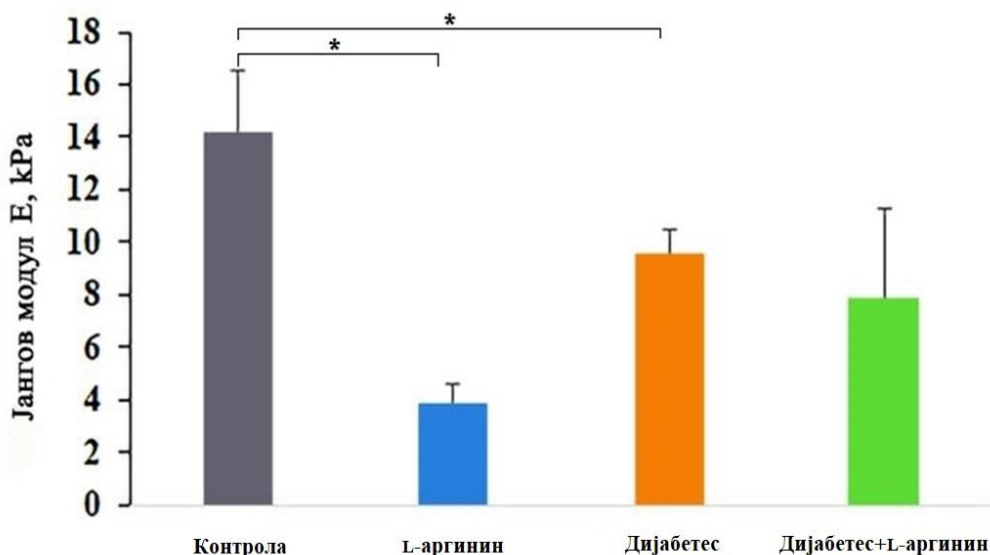
На сличан начин видимо да се интензитет вибрационих модова са позицијама на 823 cm^{-1} , 858 cm^{-1} , 917 cm^{-1} , 937 cm^{-1} , 951 cm^{-1} , 1249 cm^{-1} и 1276 cm^{-1} , посматрано у вектору оптерећења 2, повећава следећим редом: дијабетес < дијабетес+L-аргинин ~ контрола < L-аргинин. Интензитет пика на 1336 cm^{-1} у вектору оптерећења 3 на слици 20, повећава се на следећи начин: дијабетес < дијабетес+L-аргинин ~ L-аргинин < контрола.

Пикови уочени код вектора оптерећења 1 на слици 21 позиционирани на 1445 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} (CH_2 модови савијања протеина) и у региону ($1620\text{-}1700$) cm^{-1} (амид I модови) имају интензитете који се повећавају следећим редоследом: дијабетес+L-аргинин ~ контрола < L-аргинин < дијабетес.

Посматрањем вектора оптерећења 2 и скорова за компоненту 2 (графикони у средњем стубу доњег панела) на слици 21, може се закључити да се интензитет модова позиционираних између 1580 cm^{-1} и 1630 cm^{-1} повећава редоследом: L-аргинин < дијабетес < дијабетес+L-аргинин ~ контрола.

4.3.3 AFM анализа и анализа бојењем пикросиријус црвеним

AFM анализу смо користили за процену механичких својстава колагена у ткивним пресецима (у смислу вредности Јангових модула), знајући да механичка својства обезбеђују стабилност и тако регулишу многе ћелијске функције. Резултати (Слика 22) показују да све групе имају карактеристично смањен Јангов модул, али само је група третирана L-аргином показала статистички значајно смањење ригидности. У поређењу са контролном групом (100%), Јангов модул се смањивао за 32,8% у групи са дијабетесом, за 44,7% у групи са дијабетесом третираном L-аргином и за 72,9% у групи са L-аргинин третманом.

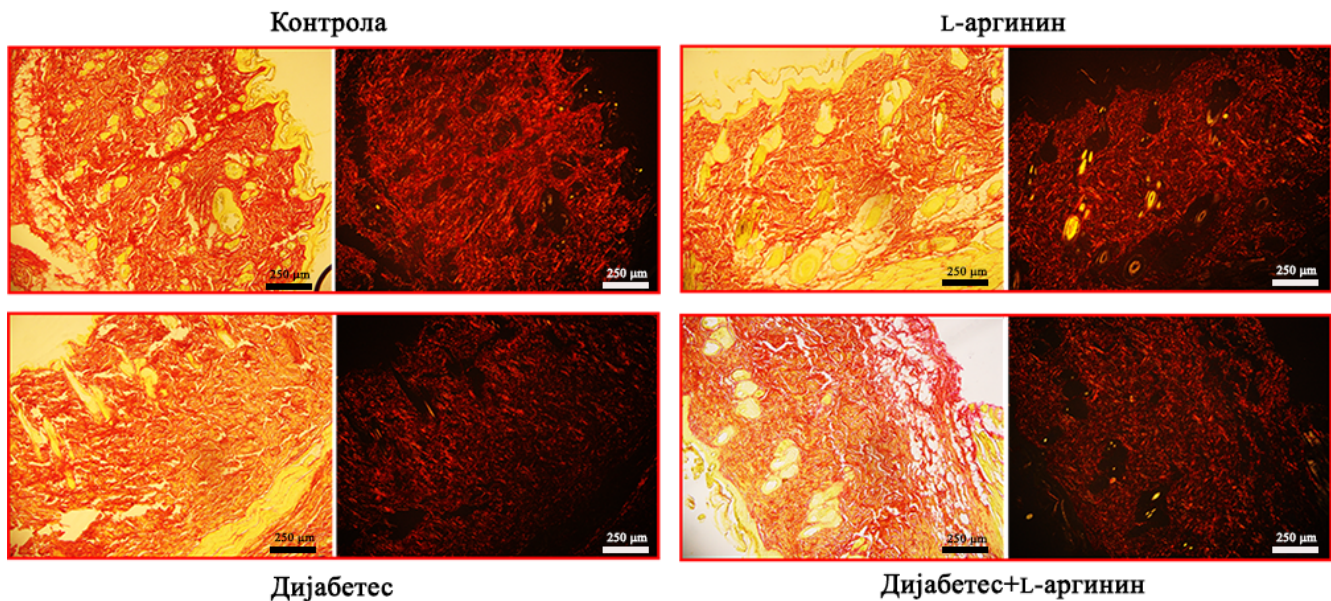


Слика 22. Јангов модул мерен коришћењем AFM у испитаним експерименталним групама. Вредности представљају средњу вредност \pm SEM. * $p < 0,05$.

Резултати показују да третман L-аргинином има значајан утицај на дијабетичну кожу и смањује њену ригидност за 11,9% када се упоређује дијабетични дермис са дијабетичним дермисом третираним L-аргинином, што може бити резултат све већег броја новосинтетисаних, младих фибрила са истовременом деградацијом старијих колагених влакана. На тај начин, третман L-аргинином утиче на промењена механичка својства колагена.

Да би проверили претходне резултате применили смо бојење истих узорка пикросиријус црвеним. Посматрано под поларизованом светлошћу дебела црвена колагена влакна се посебно истичу (Слика 23). Овај резултат је битан у процени утицаја третмана L-аргинином на дермис коже, посебно у контексту дијабетеса. Наиме, третман L-аргинином је ублажио и донекле поништио патолошке промене карактеристичне за кожу у дијабетесу.

Бојење пикросиријус црвеним (Слика 23) додатно показује промене у колагенској бирефрингенцији које подржавају промене које се виде са PSHG и огледају се у β коефицијенту и Јанговом модулу. У корелацији са резултатима Раманове спектроскопије можемо даље закључити да је оштећење колагена у раној фази дијабетеса последица дубоких конформационих промена и да третмани L-аргинина изазивају преокрет.



Слика 23. Микрографије коже пацова обојене пикросиријус црвеном бојом и анализиране без поларизатора (леве слике) и са линеарним поларизаторима (десне слике). Увећање x10, оригинал. Бар: 250 μm .

5. ДИСКУСИЈА

5.1 Модел хронолошког старења дермиса пацова

5.1.1 Поређење светлосне са модалитетима мултифотонске микроскопије – TPEF и SHG

Током протеклих година, међу нелинеарним техникама, TPEF микроскопија се издвојила као моћно средство за осликавање коже (Cicchi и сар., 2010, 2014). Захваљујући присуству ендогених флуорофора, кожа се, као и друга ткива, може лако посматрати мултифотонском микроскопијом без употребе флуоресцентне боје или агенаса. Аутофлуоресцентна својства коже потичу или из ћелија (редукован пиридин и оксидовани нуклеотиди флавина), или од ванћелијских компонената (колаген и еластин) (Yew и сар., 2014). Захваљујући значајним предностима – брзом скринингу и процедурама без обележавања, ова техника се већ увелико користи за морфолошке карактеризације на *ex vivo* узорцима ткива (Paoli и сар., 2009; Varia и сар., 2018).

Још једна нелинеарна техника осликавања, SHG микроскопија, се углавном користи за визуализацију небојених ткива богатих колагеном (Cicchi и сар., 2013; Cicchi & Pavone, 2017). Захваљујући својој не-центро-симетричној структури, фибриларни колаген је примарни извор SHG сигнала дермиса коже (Williams и сар., 2005; Chen и сар., 2012; Mostaço-Guidolin и сар., 2017). У последње време, поред коже (дермиса), SHG се такође користи за истраживање оријентације и структурних промена колагених влакана код ожиљака и келоида (Su и сар., 2009; Yu и сар., 2011; Mostaço-Guidolin и сар., 2017), тетива и лигамената (Mansfield и сар., 2008; Gusachenko и сар., 2012), компонентама кардиоваскуларног система (Doras и сар., 2011; Lopez & Larina, 2019), рожњаче (Matteini и сар., 2009), као и у микроокружењу тумора (Keikhosravi и сар., 2014; Tilbury & Campagnola, 2015; Natal и сар., 2018).

Комбинација метода TPEF и SHG је такође веома корисна за истовремену анализу и ослабавање обе компоненте дермиса (колагена и еластина) и као генерисање тродимензионалне слике високе резолуције (Cicchi и сар., 2014). SHG – Аутофлуоресцентни Индекс Старења Дермиса (SAAID -Second-harmonic to Autofluorescence Aging Index of Dermis метод), презентован од стране Lin и сар., (2005), представља једноставан начин мерења који се примењује при истовременом TPEF и SHG снимању везивног ткива. SAAID метод мери релативни однос количине колагена у односу на еластична влакна унутар дермиса у кожи. У нашем експерименту, нисмо користили ову методу јер, за разлику од коже човека, у кожи пацова доминирају колагена влакна над веома ретким еластичним влакнима. Гледано генерално, TPEF – SHG комбинација је обећавајући, поуздан и моћан алат за проучавање физиолошких и патолошких промена у кожи.

5.1.2 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика

β коефицијент израчунат са PSHG слика се често користи у истраживањима где се утврђују разлике између здравих и малигнух ткива (Hristu и сар., 2017; Tsafas и сар., 2020). Код тумора, варијације у пречнику фибрила, на попречном пресеку колагених влакана, су очигледна. У неким случајевима, ово је последица претеране агрегације фибрила (Erikson и сар., 2007), док код других, долази до ремоделовања ванћелијског матрикса путем деградације колагених влакана (Mercatelli и сар., 2020). Штавише, овај метод омогућава карактеризацију и праћење различитих експерименталних третмана у различитим ткивима (Erikson и сар., 2007). Укратко, SHG и PSHG осликавање фибриларног колагена типа I је до сада примењивано на разним узорцима, али су најчешће анализирани тетиве и кожа (Mostaço-Guidolin и сар., 2017).

Erikson и сар., (2007) су закључили да квалитативна процена угаоне зависности SHG сигнала варира у односу на структурну уређеност колагених фибрила, као и да резултати добијени од мање уређених фибриларних структура могу бити корисни при одређивању дистрибуције и оријентације сегмената влакана. Они су дошли до закључка да овај резултат може бити значајан за карактеризацију структуре фибрила као и могућих структурних промена.

Имајући у виду да само високо уређене структуре производе јак SHG сигнал, као и да незреле фибриле можемо разликовати од зрелих фибрила у рефлекционом моду (Williams и сар., 2005), израчунавање β коефицијента са PSHG слика изгледа као савршен метод за проучавање ванћелијских матриксних структура, што смо и искористили у нашем експерименту.

Поређење резултата β коефицијента добијених са PSHG слика и колагена на ултраструктурном нивоу је потврдило њихову корелацију у погледу уређености (збијености) фибрила унутар влакана као нижу, вишу или високу уређеност. Интеракција ћелија са ванћелијским матриксом је од суштинског значаја за ћелијско позиционирање, раст и диференцијацију у циљу формирања и одржавања комплексне структуре и функције ткива. Механичка својства (ригидност/затегнутост) ванћелијског матрикса се може проценити кроз густину и организацију матрикса. Како β вредности представљају молекулски поредак, дати тип анизотропије директно одражава густину паковања и оријентацију унутар колагених фибрила.

Иако је SHG добро познат као метод код кога није потребна претходна припрема или било који вид обележавања узорака, ми смо се ипак одлучили за рад на фиксираним, парафинским пресецима дебљине 5 μm , да би се избегле разлике, потенцијални проблеми и сумње у вези са употребом нативних, нефиксираних и необележених узорака ткива различите дебљине. Сви узорци су припремљени на исти начин, а процедура фиксирања је строго праћена да би се што боље очувала структура ткива, а истовремено остала што је више могуће блиска нативној.

5.1.3 ТЕМ анализа

Знајући да су оштећења колагена значајан фактор у дермалним променама везаним за старост, коришћење оптичке микроскопије није нам омогућило уочавање промена на молекулском нивоу. Наиме, упоређујући ове резултате са резултатима β коефицијента добијених са PSHG слика, приметили смо доследност у поравнавању колагених влакана. Микроструктура колагена и индекс поравнања су у складу, али је остало нејасно да ли је то последица деградације колагена. Код високо уређених колагених влакана, микрофрактуре могу индуковати уочљиве промене у пречнику и ригидности, за разлику код лабавог везивног ткива. Да би разјаснили ово, користили смо имунохистохемијске анализе за детекцију матриксних металопроотеиназа (ММР). Користили смо два различита антитела, али нисмо нашли присуство ни ММР2 ни ММР9 у свим испитаним узорцима (подаци нису приказани). Ови резултати не морају бити изненађујући, имајући у виду јако добро организовану синтезу и паковање колагених влакана у дермису пацова.

Пошто је јасно да деградација не учествује у узроковању колагених промена посматраних TPEF и SHG/PSHG, као ни у разликама код појединачних фибрила у погледу дијаметра мереним и посматраним електронском микроскопијом, даље смо анализирали оксидативна оштећења колагених влакана на серијским парафинским пресецима коже.

5.1.4 Имунохистохемијска детекција 4-HNE & N-Tyr

Акумулација ROS као и оштећења која они проузрокују, представља један од најважнијих механизма укључених у ћелијско старење (Lobo и сар., 2010; Jankovic и сар., 2019). Међутим, за ванћелијски матрикс такви докази су још увек оскудни. Недавно је показано да повећано присуство ROS може директно утицати на густину колагена, тиме што утиче на оштећења влакана; индиректно омета синтезу колагена (Borel и сар., 1988), узрокујући старење фибробласта и њихову пролиферацију (Gunin и сар., 2011).

Генерално, биомаркери оксидативног стреса се сматрају биомаркерима старења (Rinnerthaler и сар., 2015). N-Tyr је маркер оксидативних оштећења изазваних нитрацијом слободних аминокиселинских форми тирозина или остатака тирозина у протеинима, док је 4-HNE реактивни алдехид, формиран као производ липидне пероксидације, која се везује за макромолекуле, протеина посебно. Дакле, 4-HNE је такође и пропагатор липидне и протеинске оксидације.

Аминокиселине осетљиве на оксидативна оштећења (Silva и сар., 2017) су веома присутне у молекулима колагена, и као резултат оксидације аминокиселинских остатака, фрагментације протеина, може доћи до агрегације и протеолитичке дигестије. Колаген је подложен фрагментацији узрокованој супероксид анјоном радикалом, као што је показано ослобађањем малих пептида који садрже 4-хидроксипролин (Hawkins & Davies, 1997).

Колико је нама познато, ово је први приказ позитивности колагена на 4-HNE и N-Tyr. Ово би могло бити основни разлог за уочене промене код биофотоничких својства, као

што су ригидност (више вредности β коефицијента) и ултраструктурна оштећења колагена током хронолошког старења која превазилазе природно високу генетску и структурну стабилност молекула колагена у кожи пацова.

Наши резултати су такође показали одсуство MMP2 и MMP9, што сугерише да у старењу, бар у дермису пацова, ове оксидативне модификације на појединачним молекулима колагена пре доводе до значајније агрегације, него до деградације колагена.

5.2 Модел ремоделирања дермиса пацова третманом L-аргинином

5.2.1 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика

Претходна истраживања су показала да се ефекти L-аргинина (првенствено на нивоу панкреаса, али и системски) постижу путем NO синтезе и/или повећаном биодоступношћу NO (Vasilijević и сар., 2007; Jankovic и сар., 2016; Stancic и сар., 2018). Тако, корисни ефекти L-аргинина на дермалном колагену, ремоделирање, представљају последицу NO синтезе путем индукције ензима синтаза. Благотворан ефекат третмана L-аргинином огледа у спречавању организације високо уређених колагених влакана посредством NO. У сагласности са тим су уочене промене у уређењу влакана колагена и 3D организацији које указују на дермално „омекшавање“ тј. смањење тврдоће у корист еластичности.

С обзиром на чињенице да се L-аргинин користи за контролу порозности 3D биомиметских еластичних ткивних заменика (Tsaï и сар., 2017), а NO-донори се користе за брже зарастање рана (Blecher и сар., 2012; Han и сар., 2012), наши резултати указују на то да треба пажљиво направити баланс како би се поставила жељена NO концентрација у било ком моделу замена или предтретмана на бази колагена.

5.2.2 TEM анализа

Неочекивано, третман са L-NAME није у потпуности поништио ефекат L-аргинина, односно, није вратио пречнике колагених фибрила ка контролним вредностима (Слика 12 б). Ово може бити последица L-аргинин/NO индуковане синтезе колагена, где су новоформирана и тек сазрела колагена влакна присутна у дермису (Reilly & Lozano, 2021). Иако је просечан пречник у овој групи 80 nm, као и код L-аргинина, око 70% фибрила има пречник између 80 и 120 nm. За даље истраживање овог феномена су потребни додатни експерименти и наша будућа истраживања биће усмерена ка томе.

5.2.3 Анализа Рамановом спектроскопијом

Полипептидни ланци који формирају структурне јединице колагена у кожи пацова садрже углавном аминокиселине глицин (33%), пролин (21%), аланин (11%), 3- и 4-

хидроксипролин и 5-хидроксилизин, повезане заједно у понављајући X-Y-Gly образац (Прокори и сар., 2021). Рамановим спектром колагена доминирају карактеристични модови ових аминокиселина заједно са амид I и амид III тракама. Амидне траке у Рамановом спектру протеина су области у којима се јављају модови вибрација амидних веза окоснице (скелета) протеина. Генерално се користе за детектовање разлика у секундарним структурама, што је веома важно за колаген, јер секундарне структуре обезбеђују и стабилност и структуру колагених фибрила.

Ну и сар., (2022) предлажу аргинин као физиолошки супстрат за синтезу транс-4-хидроксил-пролина, транс-3-хидрокси-L-пролина, глицина и гликоксилата. Штавише, аргинин може да се хидролизује аргиназом у уреу и орнитин, који се метаболише у пролин. Пролин је уграђен у колаген чија хидроксилација даје транс-4-хидрокси-L-пролин и транс-3-хидрокси-L-пролин. У складу са тим је пораст пролинских Раманових модова (926 cm^{-1} , 943 cm^{-1} , 1067 cm^{-1}) који смо регистровали након третмана L-аргинином (Табела 1).

Понашање модова на 837 cm^{-1} , 858 cm^{-1} и 1165 cm^{-1} сугерише молекулску реоријентацију тирозина у структури колагена. Остаци ароматичних аминокиселина (фенилаланин и тирозин) могу ступити у ароматично-ароматичне интеракције, што доводи до пораста удела трију различитих конформационих геометрија (Contorno и сар., 2021).

Имунохистохемијско бојење на нитротирозин показало је додатну модификацију тирозина у колагену због производње NO из L-аргинина (Слика 16). Ово може утицати на модификацију терцијарне структуре постојећег колагена и/или сведочити о постојању новосинтетизованих молекула који имају тенденцију да успоставе 3D структуру у ванћелијском простору. Ово је у складу са раније показаним резултатима (Contorno и сар., 2021), да се присуство ароматичних аминокиселина у протеинима генерално сматра фактором који доприноси дестабилизацији њихове терцијарне структуре изазивајући смањење њихове 3D структурне ригидности и појачану протеинску деструкцију. Такође, горе поменути резултати иду у прилог томе да L-аргинин третман помера β вредности ка нижим вредностима што је у сагласности са запаженим присуством тањих колагених фибрила.

Амиди III и I су такође коришћени за процену конформационих промена у структури колагена: оријентација колагених влакана, деградација и денатурација колагена као и ниво нарушености секундарне структуре протеина (Van Gulick и сар., 2019). Након L-аргинин и L-NAME третмана, интензитет амид III и амид I трака се повећава. Запажено понашање осликава конформационе промене протеина и вероватно повећање релативног садржаја амида.

Регистровани пораст интензитета пролинских Раманових модова, као и вибрационих модова молекуларног скелета колагена и деформација бочних

аминокиселинских ланаца (Табела 1) подржавају описане модификације и конформационе промене које утичу на реорганизацију фибрила колагена у дермису пацова.

5.3 Модел експериментално изазваног дијабетеса типа 1 и третмана L-аргинином

5.3.1 Резултати β коефицијента добијених са PSHG слика

Као патолошко стање, дијабетес нарушава заштитни механизам коже нарушавањем структуре колагена (Argyropoulos и сар., 2016). Наши резултати показују да третман L-аргинином снижава вредности β коефицијента у поређењу са контролом потврђујући његову улогу у обнављању коже (Gad, 2010; Fujiwara и сар., 2014). Наиме, L-аргинин побољшава стање коже промовисањем синтезе колагена и пролиферације ћелија и након кратких третмана (Frank и сар., 2002; Stechmiller и сар., 2005; Wittmann и сар., 2005). У нашем моделу показали смо да се L-аргинин може користити за ублажавање и/или спречавање даљих оштећења у кожи у раној фази дијабетеса типа 1.

5.3.2 Анализа Рамановом спектроскопијом

Позиција Рамановог мода на 1336 cm^{-1} одговара $-\text{CH}_3\text{CH}_2$ деформацијама колагена ($-\text{CH}_3\text{CH}_2$ машућа (енг. *wagging*)/ $-\text{CH}_2$ маказаста (енг. *scizoring*) вибрација) (Stone и сар., 2004; Martinez и сар., 2019). Деформације CH_3/CH_2 се такође одражавају у опсегу 1320 cm^{-1} , који представља увијање (енг. *twisting*) $-\text{CH}_3\text{CH}_2$ унутар колагена (Stone и сар., 2004). Интензитет оба мода се смањује код дијабетичне коже и и обнавља у дијабетичној кожи третираној L-аргинином. Ово сугерише конформационе промене повезане са молекулском реоријентацијом у дијабетичној кожи и накнадним опоравком колагених влакана након третмана. Пикови на 1544 cm^{-1} и 1557 cm^{-1} могу одговарати амиду II и триптофану (Movasaghi и сар., 2007; Anastassopoulou и сар., 2019). Трака амид II се обично не уочава са побудним таласним линијама изнад 400 nm , али пошто колаген пацова не садржи триптофан, ове траке највероватније припадају амиду II. Амид II трака обично је под утицајем β -конформације протеина и померање ове траке на ниже фреквенције указује на промене у секундарној структури протеина, тј. на конформационе промене (Hernández и сар., 2016). Вибрациони мод постављен на 1594 cm^{-1} одговара вибрацијама фенилаланина (Movasaghi и сар., 2007; Hernández и сар., 2013). Као што видимо из горе наведених података, интензитет модова амида II и фенилаланина ове групе модова се смањује у узорку дијабетичне коже у поређењу са контролом, али се поново повећава и приближава спектрима контроле након третмана са L-аргинином. Овај резултат говори да третман L-аргинином неутралише промене секундарне структуре колагена, које се односе на садржај бета конформација, као и на изложеност фенилаланинских остатака, тако да се структура колагена у дијабетичном дермису враћа ка структури здравог ткива.

Мод на 823 cm^{-1} одговара С-С истезању скелета молекула колагена. Мод на 831 cm^{-1} одговара вибрацији тирозина (Movasaghi и сар., 2007; Hernández и сар., 2016). Позиција на 858 cm^{-1} може да одговара аминокиселинама пролин, хидроксипролин и тирозин (Martinez и сар., 2019), као и С-С вибрацији колагеног скелета, због чега није поуздано тумачити његово понашање. Мод на 917 cm^{-1} одговара С-С истезању пролинског прстена (Nguyen и сар., 2012; Van Gulick и сар., 2019). Интензитет сва четири наведена мода се у дијабетичној кожи смањује у односу на контролу, док након третмана L-аргинином расте изнад нивоа контроле.

Мод на 934 cm^{-1} такође показује мањи интензитет у дијабетичној кожи у поређењу са контролом, што је у складу са литературним подацима (Spanheimer и сар., 1988; Argurooulos и сар., 2016). Истом моду се повећава интензитет код дијабетичне групе третиране L-аргинином (померен на $\sim 937\text{ cm}^{-1}$), очигледно показујући супротан/обрнути ефекат L-аргинина на промене изазване дијабетесом. Ова позиција одговара вибрацији истезања пролина или колагеног скелета (Stone и сар., 2004; Cheng и сар., 2005; Nguyen и сар., 2012; Prokopi и сар., 2021; Contorno и сар., 2021), што указује на интензивну структурну реорганизацију. У ову групу модова, чији интензитети опадају код спектра дијабетичне коже, али се повећавају након третмана дијабетичне групе са L-аргинином и приближавају се интензитетима спектра контролне групе, убрајају се и Раманови модови на 1249 cm^{-1} и 1276 cm^{-1} , повезани са вибрацијама амид III трака (Stone и сар., 2004; Su и сар., 2019). Овај резултат указује да ова група модова показује јачу структурну промену од прве групе (1320 cm^{-1} , 1336 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1557 cm^{-1}). Резултат је у складу са патологијом дијабетеса, где очекујемо најизраженије конформационе промене (тј. деградацију), које би требало да утичу на аминокиселине са највећим садржајем у структури колагена, као што су пролин и хидроксипролин.

Сматра се да експресија ароматичних аминокиселина као што је тирозин доприноси дестабилизацији терцијарне структуре протеина, што може утицати на њихову 3D структурну ригидност (Contorno и сар., 2021). Ово је у складу са нашим резултатима, јер смо посматрали промене и на биохемијском и на механичком нивоу које доводе до реорганизације колагене структуре. Тирозину се такође може приписати и мод на 951 cm^{-1} , који, према Joodaki и сар., (2019) потиче од вибрација атома ван равни и чији се интензитет значајно повећава након третмана са L-аргинином, што указује на снажан притисак на 3D структуру (или терцијарну структуру) молекула колагена (а самим тим и реорганизацију).

У спектралном опсегу ($1000\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$), неколико модова у спектру дијабетичне коже повећава интензитет у односу на контролни узорак, као што су 1035 cm^{-1} , 1067 cm^{-1} и 1100 cm^{-1} , који су повезани са фенилаланином и пролином (Stone и сар., 2004; Cárcamo и сар., 2012; Van Gulick и сар., 2019). Према Cárcamo и сар., (2012), пролин има ширу траку на 1100 cm^{-1} , која се приписује N-C-H деформацији, са повећаним интензитетом у дијабетичној кожи, што указује на структурну деградацију молекула колагена (Goulding,

2015; Huang & Kyriakides, 2020; Moraes и сар., 2023), што сматрамо патолошким механизмом. Интензитет ових модова не опада након третмана са L-аргинином.

Вибрациони модови на 1445 cm^{-1} и 1465 cm^{-1} указују на CH_3CH_2 деформацију колагена. Модови у распону $1640\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ представљају амид I модове. Обе групе модова показују повећан интензитет у дијабетичној кожи и веома су близу по интензитету у контролној групи и групи која је третирана L-аргинином. Ови резултати сугеришу да су конформационе промене изражајније код пацова са дијабетесом, док третман L-аргинином враћа те промене ка контролним вредностима.

5.3.3 AFM анализа и анализа бојењем пикросириус црвеним

Резултати AFM анализе показују да је за све групе карактеристичан смањени Јангов модул, али да је само група третирана L-аргинином показала статистички значајно смањење ригидности. Ово се очекује јер се L-аргинин користи за обнављање коже кроз NO молекулски механизам (Saini и сар., 2013; Fujiwara и сар., 2014; de Souza и сар., 2017). Смањена ригидност код дијабетеса је вероватно последица деградације и фрагментације колагенских фибрила (Argyropoulos и сар., 2016). У овој студији показало се да третман L-аргинином има значајан утицај на дијабетичну кожу смањењем ригидности за 11,9% када се упоређују група са дијабетесом са групом са дијабетесом третираном L-аргинином, што може бити резултат све већег броја младих и новосинтетизованих фибрила са истовременом деградацијом старијих колагенских влакана. Третман L-аргинином стога утиче на промену механичких својстава колагена.

Уочено смањење Јанговог модула, које се приписује третману L-аргинином, на први поглед може изгледати штетно с обзиром на механичку чврстоћу коју обезбеђује колаген. Међутим, у контексту дијабетичне коже, коју карактерише повећана ригидност и подложност оштећењима, смањење ригидности би потенцијално могло побољшати савитљивост и отпорност коже. Наша потврда утицаја L-аргинина претежно на колаген је од великог значаја, с обзиром на његову примарну улогу у механичким својствима коже.

Са друге стране, морамо да наведемо да се у разматрање ригидности коже морају узети у обзир присуство и промене у садржају гликозаминогликана и других компоненти ванћелијског матрикса. Међутим, циљ наше студије био је да процени релативне варијације ригидности између различитих експерименталних група, а не њене апсолутне вредности кроз промене вредности за колаген. То је у складу са постојећим литературним подацима у којима је показана и потврђена примена AFM у процени механичких својстава коже кроз Јангов модул колагена на фиксираним узорцима ткива (Kotova и сар., 2015).

Овај резултат јасно указује да третман L-аргинином може допринети нормализацији структурног интегритета коже у дијабетесу модулисањем колагене компоненте ванћелијског матрикса. Корисни ефекти L-аргинина показују потенцијал не само за мењање механичких својстава; они такође промовишу организовану и потенцијално функционалнију колагену мрежу унутар дермиса коже. У корелацији са нашим

результатима Раманове спектроскопије, можемо даље закључити да је оштећење колагена у раној фази дијабетеса последица дубоких конформационих промена и да их третман L-аргинином ублажава и делимично поништава. Наши резултати дају допринос разумевању терапијског потенцијала L-аргинина у побољшању здравља коже у патолошким условима као што је дијабетес, отварајући пут за његово даље истраживање и примену.

6. ЗАКЉУЧЦИ

- Наши резултати јасно показују да су анализе TPEF и SHG слика дермиса пацова, током хронолошког старења, у складу са хистолошким; Дермис пацова је добар модел не само због биофотоничких својстава колагена, већ и стабилности.
- Резултати хронолошког старења дермиса пацова добијени израчунавањем β коефицијента са PSHG слика су у складу са резултатима добијеним на трансмисионој електронској микроскопији.
- β коефицијент одражава fine промене на колагеним влакнима услед оксидативних оштећења, видљиве само имунохистохемијским анализама и на ултраструктурном нивоу. Напредни методи микроскопије могу се користити и на фиксираним узорцима и заједно са конвенционалним методима за даље анализе. На овај начин, ће се избећи деградација узорака, а репродуктивност и стандардизација протокола биле би у потпуности остварене.
- Наши резултати доказују да је NLSM метод погодан за употребу на претходно фиксираним узорцима, отварајући могућност за поновно испитивање парафинских архивираних узорака. Нови увиди у дермалне структуре и њихово поређење, могу довести до открића потпуно нових услова под којима кожа стари.
- PSHG снимање је брз и поуздан скрининг метод за проучавање промена у структури колагенатом хронолошког старења повезаних са оксидативним стресом; може се користити у било којој даљој анализи која се односи на структурне алтерације колагена, као што је фотостарење, испорука лекова, патолошка промена коже код малигних обољења итд., и отвара прилику за преиспитивање ових промена у архивираним узорцима.
- Мултимодална анализа (PSHG, SM, TEM и Микро-Раманова спектроскопија) дермалног колагена открила је повећање садржаја пролина/хидроксипролина, нитрације тирозина и последичну реорганизацију структуре колагена због L-аргинина *per se*, као прекурсора пролина, и NO синтезе. Ова врста анализе има велики потенцијал за процену дермалног ремоделирања у зарастању рана или конструисању дермалних замена на бази колагена, и може се искористити за клиничку примену.
- Подаци из литературе показују да промене у наноморфологији и механичким својствима колагених фибрила које доприносе старењу коже код дијабетеса, могу бити последица накупљања унакрсно повезаних колагених нанофрагмената. Наш мултимодални приступ дијагностици показао је да су делимична интрамолекуларна фрагментација колагена и умрежавање изазвано дијабетесом довеле до промена механичких својстава дермиса, што је показано AFM. Наиме, бочно паковање и преплитање заједно са парцијалном интрамолекуларном фрагментацијом изазивају слабљење колагених својстава. Третман L-аргинином,

чак и краткотрајан, поправља наведена оштећења. Наши резултати су јасно показали да се L-аргинин може користити за побољшање или спречавање оштећења колагених влакана код дијабетичне коже.

7. ЛІТЕРАТУРА

- Adler, B. L., & Friedman, A. J. (2015). Nitric oxide therapy for dermatologic disease. *Y Future Science OA* (Том 1, Бpoj 1). <https://doi.org/10.4155/fso.15.37>
- Aghigh, A., Bancelin, S., Rivard, M., Pinsard, M., Ibrahim, H., & Légaré, F. (2023). Second harmonic generation microscopy: a powerful tool for bio-imaging. *Y Biophysical Reviews* (Том 15, Бpoj 1). <https://doi.org/10.1007/s12551-022-01041-6>
- Albina, J. E., Abate, J. A., & Mastrofrancesco, B. (1993). Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. *Journal of Surgical Research*, 55(1). <https://doi.org/10.1006/jsre.1993.1114>
- Albina, J. E., Mills, C. D., Barbul, A., Thirkill, C. E., Henry, W. L., Mastrofrancesco, B., & Caldwell, M. D. (1988). Arginine metabolism in wounds. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 254(4). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.254.4.e459>
- Anastassopoulou, J., Kyriakidou, M., Malesiou, E., Rallis, M., & Theophanides, T. (2019). Infrared and Raman spectroscopic studies of molecular disorders in skin cancer. *In Vivo*, 33(2). <https://doi.org/10.21873/invivo.11512>
- Aptel, F., Olivier, N., Deniset-Besseau, A., Legeais, J. M., Plamann, K., Schanne-Klein, M. C., & Beaurepaire, E. (2010). Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(5). <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4586>
- Argyropoulos, A. J., Robichaud, P., Balimunkwe, R. M., Fisher, G. J., Hammerberg, C., Yan, Y., & Quan, T. (2016). Alterations of dermal connective tissue collagen in diabetes: Molecular basis of aged-appearing skin. *PLoS ONE*, 11(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153806>
- Baria, E., Nesi, G., Santi, R., Maio, V., Massi, D., Pratesi, C., Cicchi, R., & Pavone, F. S. (2018). Improved label-free diagnostics and pathological assessment of atherosclerotic plaques through nonlinear microscopy. *Journal of Biophotonics*, 11(11). <https://doi.org/10.1002/jbio.201800106>
- Bergholt, M. S., Serio, A., & Albro, M. B. (2019). Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(November), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00303>
- Birk, J. W., Tadros, M., Moezardalan, K., Nadyarnykh, O., Forouhar, F., Anderson, J., & Campagnola, P. (2014). Second harmonic generation imaging distinguishes both high-grade dysplasia and cancer from normal colonic mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(7). <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3121-7>
- Black, E., Vibe-Petersen, J., Jorgensen, L. N., Madsen, S. M., Ågren, M. S., Holstein, P. E., Perrild, H., & Gottrup, F. (2003). Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control. *Archives of Surgery*, 138(1). <https://doi.org/10.1001/archsurg.138.1.34>

- Blakytyn, R., & Jude, E. B. (2009). Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 8(2). <https://doi.org/10.1177/1534734609337151>
- Blecher, K., Martinez, L. R., Tuckman-Vernon, C., Nacharaju, P., Schairer, D., Chouake, J., Friedman, J. M., Alfieri, A., Guha, C., Nosanchuk, J. D., & Friedman, A. J. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(8). <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.02.014>
- Borel, J., Monboisse, J., & Bellon, G. (1988). Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. *Médecine/Sciences*, 4(5), 304. <https://doi.org/10.4267/10608/3820>
- Buranasin, P., Mizutani, K., Iwasaki, K., Mahasarakham, C. P. N., Kido, D., Takeda, K., & Izumi, Y. (2018). High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PLoS ONE*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201855>
- Cárcamo, J. J., Aliaga, A. E., Clavijo, R. E., Brañes, M. R., & Campos-Vallette, M. M. (2012). Raman study of the shockwave effect on collagens. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 86, 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.10.049>
- Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., & Campagnola, P. J. (2012). Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature Protocols*, 7(4), 654–669. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.009>
- Cheng, W. T., Liu, M. T., Liu, H. N., & Lin, S. Y. (2005). Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. *Microscopy Research and Technique*, 68(2). <https://doi.org/10.1002/jemt.20229>
- Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., De Giorgi, V., Maio, V., Van Wiechen, A., Massi, D., Lotti, T., & Pavone, F. S. (2010). Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *Journal of Biophotonics*, 3(1–2), 34–43. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910062>
- Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., & Pavone, F. S. (2014). Clinical Nonlinear Laser Imaging of Human Skin: A Review. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/903589>
- Cicchi, R., & Pavone, F. S. (2017). Probing collagen organization: Practical guide for second-harmonic generation (SHG) imaging. *Y Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_27
- Cicchi, R., Vogler, N., Kapsokalyvas, D., Dietzek, B., Popp, J., & Pavone, F. S. (2013). From molecular structure to tissue architecture: Collagen organization probed by SHG microscopy. *Journal of Biophotonics*, 6(2), 129–142. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200092>
- Contorno, S., Darienzo, R. E., & Tannenbaum, R. (2021). Evaluation of aromatic amino acids as potential biomarkers in breast cancer by Raman spectroscopy analysis. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81296-3>

- de Souza, Á. do P. B., de Oliveira, M. M. R., de Andrade, R. R., de Amorim, R. F. B., Bocca, A. L., & Borin, M. de F. (2017). The in vivo effect of L-arginine on skin elasticity in mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(3). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000300045>
- Diller, R. B., & Tabor, A. J. (2022). The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Y Biomimetics* (Том 7, Бpoj 3). <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030087>
- Domínguez-Oliva, A., Hernández-Ávalos, I., Martínez-Burnes, J., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., & Mota-Rojas, D. (2023). The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications. *Y Animals* (Том 13, Бpoj 7). <https://doi.org/10.3390/ani13071223>
- Doras, C., Taupier, G., Barsella, A., Mager, L., Boeglin, A., Bulou, H., Bousquet, P., & Dorkenoo, K. D. (2011). Polarization state studies in second harmonic generation signals to trace atherosclerosis lesions. *Optics Express*, 19(16), 15062. <https://doi.org/10.1364/oe.19.015062>
- Dorsett-Martin, W. A. (2004). Rat models of skin wound healing: A review. *Y Wound Repair and Regeneration* (Том 12, Бpoj 6). <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x>
- Dremin, V., Marcinkevics, Z., Zherebtsov, E., Popov, A., Grabovskis, A., Kronberga, H., Geldnere, K., Doronin, A., Meglinski, I., & Bykov, A. (2021). Skin Complications of Diabetes Mellitus Revealed by Polarized Hyperspectral Imaging and Machine Learning. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 40(4), 1207–1216. <https://doi.org/10.1109/TMI.2021.3049591>
- Dubey, H., Dubey, A., Gulati, K., & Ray, A. (2022). PROTECTIVE EFFECTS OF L-ARGININE ON COGNITIVE DEFICITS AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TYPE-2 DIABETES MELLITUS INDUCED ALZHEIMER'S DISEASE IN RATS. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 73(1). <https://doi.org/10.26402/jpp.2022.1.01>
- Dudenkova, V. V., Shirmanova, M. V., Lukina, M. M., Feldshtein, F. I., Virkin, A., & Zagainova, E. V. (2019). Examination of Collagen Structure and State by the Second Harmonic Generation Microscopy. *Biochemistry (Moscow)*, 84, 89–107. <https://doi.org/10.1134/S0006297919140062>
- Erikson, A., Örtegren, J., Hompland, T., de Lange Davies, C., & Lindgren, M. (2007). Quantification of the second-order nonlinear susceptibility of collagen I using a laser scanning microscope. *Journal of Biomedical Optics*, 12(4), 044002. <https://doi.org/10.1117/1.2772311>
- Figueroa-Romero, C., Sadidi, M., & Feldman, E. L. (2008). Mechanisms of disease: The oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Y Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* (Том 9, Бpoj 4). <https://doi.org/10.1007/s11154-008-9104-2>
- Forzano, I., Avvisato, R., Varzideh, F., Jankauskas, S. S., Cioppa, A., Mone, P., Salemme, L., Kansakar, U., Tesorio, T., Trimarco, V., & Santulli, G. (2023). L-Arginine in diabetes: clinical and preclinical evidence. *Y Cardiovascular Diabetology* (Том 22, Бpoj 1). <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01827-2>

- Frank, S., Kämpfer, H., Wetzler, C., & Pfeilschifter, J. (2002). Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator. *Kidney International*, 61(3). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00237.x>
- Fujiwara, T., Kanazawa, S., Ichibori, R., Tanigawa, T., Magome, T., Shingaki, K., Miyata, S., Tohyama, M., & Hosokawa, K. (2014). L-Arginine stimulates fibroblast proliferation through the GPRC6A-ERK1/2 and PI3K/Akt pathway. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092168>
- Gad, M. Z. (2010). Anti-aging effects of L-arginine. *Journal of Advanced Research*, 1(3), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.001>
- Gambardella, J., Khondkar, W., Morelli, M. B., Wang, X., Santulli, G., & Trimarco, V. (2020). Arginine and endothelial function. *Y Biomedicines* (Tom 8, Bpoj 8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8080277>
- Gavgiotaki, E., Filippidis, G., Tsafas, V., Bovasianos, S., Kenanakis, G., Georgoulas, V., Tzardi, M., Agelaki, S., & Athanassakis, I. (2020). Third Harmonic Generation microscopy distinguishes malignant cell grade in human breast tissue biopsies. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67857-y>
- Gheibi, S., & Ghasemi, A. (2020). Insulin secretion: The nitric oxide controversy. *Y EXCLI Journal* (Tom 19). <https://doi.org/10.17179/excli2020-2711>
- González, P., Lozano, P., Ros, G., & Solano, F. (2023). Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *Y International Journal of Molecular Sciences* (Tom 24, Bpoj 11). <https://doi.org/10.3390/ijms24119352>
- Goulding, V. (2015). The effects of diabetes on collagen within wound healing. *The Diabetic Foot Journal*, 18(2).
- Gunin, G., Kornilova, N. K., Petrov, V. V., & Vasilyeva, O. V. (2011). Age changes in the number and proliferation of fibroblasts in the human skin. *Advances in Gerontology*, 1(4), 299–303. <https://doi.org/10.1134/S2079057011040059>
- Gusachenko, I., Tran, V., Houssen, Y. G., Allain, J. M., & Schanne-Klein, M. C. (2012). Polarization-resolved second-harmonic generation in tendon upon mechanical stretching. *Biophysical Journal*, 102(9), 2220–2229. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.068>
- Han, G., Nguyen, L. N., MacHerla, C., Chi, Y., Friedman, J. M., Nosanchuk, J. D., & Martinez, L. R. (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition. *American Journal of Pathology*, 180(4). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.12.013>
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (1997). Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: Random attack or site-specific damage? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1360(1), 84–96. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(96\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(96)00069-5)

- Hermanowicz, P., Sarna, M., Burda, K., & Gabryś, H. (2014). AtomicJ: An open source software for analysis of force curves. *Review of Scientific Instruments*, 85(6). <https://doi.org/10.1063/1.4881683>
- Hernández, B., Coić, Y. M., Pflüger, F., Kruglik, S. G., & Ghomi, M. (2016). All characteristic Raman markers of tyrosine and tyrosinate originate from phenol ring fundamental vibrations. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(2). <https://doi.org/10.1002/jrs.4776>
- Hernández, B., Pflüger, F., Kruglik, S. G., & Ghomi, M. (2013). Characteristic Raman lines of phenylalanine analyzed by a multiconformational approach. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(6). <https://doi.org/10.1002/jrs.4290>
- Horton, N. G., Wang, K., Kobat, D., Clark, C. G., Wise, F. W., Schaffer, C. B., & Xu, C. (2013). In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature Photonics*, 7(3). <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.336>
- Hristu, R., Stanciu, S. G., Dumitru, A., Eftimie, L. G., Paun, B., Tranca, D. E., Gheorghita, P., Costache, M., & Stanciu, G. A. (2022). PSHG-TISS: A collection of polarization-resolved second harmonic generation microscopy images of fixed tissues. *Scientific Data*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01477-1>
- Hristu, R., Stanciu, S. G., Tranca, D. E., & Stanciu, G. A. (2017). Improved quantification of collagen anisotropy with polarization-resolved second harmonic generation microscopy. *Journal of Biophotonics*, 10(9), 1171–1179. <https://doi.org/10.1002/jbio.201600197>
- Hu, S., He, W., & Wu, G. (2022). Hydroxyproline in animal metabolism, nutrition, and cell signaling. *Amino Acids*, 54(4), 513–528. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03056-x>
- Huang, Y., & Kyriakides, T. R. (2020). The role of extracellular matrix in the pathophysiology of diabetic wounds. *Matrix Biology Plus*, 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100037>
- Jankovic, A., Ferreri, C., Filipovic, M., Ivanovic-Burmazovic, I., Stancic, A., Otasevic, V., Korac, A., Buzadzic, B., & Korac, B. (2016). Targeting the superoxide/nitric oxide ratio by L-arginine and SOD mimic in diabetic rat skin. *Free Radical Research*, 50(September), S51–S63. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1232483>
- Jankovic, A., Saso, L., Korac, A., & Korac, B. (2019). Relation of Redox and Structural Alterations of Rat Skin in the Function of Chronological Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2471312>
- Jiang, X., Zeng, Y. E., Li, C., Wang, K., & Yu, D. G. (2024). Enhancing diabetic wound healing: advances in electrospun scaffolds from pathogenesis to therapeutic applications. *Y Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Tom 12). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1354286>
- Joodaki, F., Martin, L. M., & Greenfield, M. L. (2019). Planarity and out-of-plane vibrational modes of tryptophan and tyrosine in biomolecular modeling. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(43), 23943–23965. <https://doi.org/10.1039/c9cp04798k>

- Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., & Chapman, J. A. (1996). Collagen fibril formation. *Y Biochemical Journal* (Том 316, Бpoj 1). <https://doi.org/10.1042/bj3160001>
- Keikhosravi, A., Bredfeldt, J. S., Sagar, A. K., & Eliceiri, K. W. (2014). Second-harmonic generation imaging of cancer. *Y Methods in Cell Biology* (1st изд., Том 123). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00028-8>
- Kotova, S. L., Timashev, P. S., Guller, A. E., Shekhter, A. B., Misurkin, P. I., Bagratashvili, V. N., & Solovieva, A. B. (2015). Collagen Structure Deterioration in the Skin of Patients with Pelvic Organ Prolapse Determined by Atomic Force Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 21(2). <https://doi.org/10.1017/S1431927615000148>
- Lau, D. P., Huang, Z., Lui, H., Man, C. S., Berean, K., Morrison, M. D., & Zeng, H. (2003). Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx - Preliminary findings. *Lasers in Surgery and Medicine*, 32(3). <https://doi.org/10.1002/lsm.10084>
- Leiss, V., Flockerzie, K., Novakovic, A., Rath, M., Schönsiegel, A., Birnbaumer, L., Schürmann, A., Harteneck, C., & Nürnberg, B. (2014). Insulin secretion stimulated by l-arginine and its metabolite l-ornithine depends on Gai2. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 307(9). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00337.2014>
- Li, P., & Wu, G. (2018). Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Y Amino Acids* (Том 50, Бpoj 1). <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2490-6>
- Lin, S.-J., Wu, R.-J., Tan, H.-Y., Lo, W., Lin, W.-C., Young, T.-H., Hsu, C.-J., Chen, J.-S., Jee, S.-H., & Dong, C.-Y. (2005). Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Optics Letters*, 30(17), 2275. <https://doi.org/10.1364/ol.30.002275>
- Liu, C. Y., Matsusaki, M., & Akashi, M. (2015). Cell effects on the formation of collagen triple helix fibers inside collagen gels or on cell surfaces. *Polymer Journal*, 47(5). <https://doi.org/10.1038/pj.2015.2>
- Liu, Y., Liu, Y., He, W., Mu, X., Wu, X., Deng, J., & Nie, X. (2022). Fibroblasts: Immunomodulatory factors in refractory diabetic wound healing. *Y Frontiers in Immunology* (Том 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.918223>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lopez, A. L., & Larina, I. V. (2019). Second harmonic generation microscopy of early embryonic mouse hearts. *Biomedical Optics Express*, 10(6), 2898. <https://doi.org/10.1364/boe.10.002898>

- Magliano, D. J., & Boyko, E. J. (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee*. IDF DIABETES ATLAS [Internet]. Brussels.
- Man, M. Q., Wakefield, J. S., Mauro, T. M., & Elias, P. M. (2022). Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. *Y Inflammation* (Том 45, Број 3). <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01615-8>
- Mansfield, J. C., Winlove, C. P., Moger, J., & Matcher, S. J. (2008). Collagen fiber arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 13(4), 044020. <https://doi.org/10.1117/1.2950318>
- Martinez, M. G., Bullock, A. J., MacNeil, S., & Rehman, I. U. (2019). Characterisation of structural changes in collagen with Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 54(6), 509–542. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1506799>
- Massella, D., Argenziano, M., Ferri, A., Guan, J., Giraud, S., Cavalli, R., Barresi, A. A., & Salaün, F. (2019). Bio-functional textiles: Combining pharmaceutical nanocarriers with fibrous materials for innovative dermatological therapies. *Y Pharmaceutics* (Том 11, Број 8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080403>
- Matteini, P., Ratto, F., Rossi, F., Cicchi, R., Stringari, C., Kapsokalyvas, D., Pavone, F. S., & Pini, R. (2009). Photothermally-induced disordered patterns of corneal collagen revealed by SHG imaging. *Optics Express*, 17(6), 4868. <https://doi.org/10.1364/oe.17.004868>
- Mercatelli, R., Triulzi, T., Pavone, F. S., Orlandi, R., & Cicchi, R. (2020). Collagen ultrastructural symmetry and its malignant alterations in human breast cancer revealed by polarization-resolved second-harmonic generation microscopy. *Journal of Biophotonics*. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000159>
- Michael H. Ross, P. (deceased), & Wojciech Pawlina. (2014). HISTOLOGY A TEXT AND ATLAS with Correlated Cell and Molecular Biology. *Y Psychological Science* (Том 25, Број 9).
- Miler, I., Rabasovic, M. D., Aleksic, M., Krmpot, A. J., Kalezic, A., Jankovic, A., Korac, B., & Korac, A. (2021). Polarization-resolved SHG imaging as a fast screening method for collagen alterations during aging: Comparison with light and electron microscopy. *Journal of Biophotonics*, 14(3), 1–11. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000362>
- Mohan, I. K., & Das, U. N. (1998). Effect of L-arginine-nitric oxide system on chemical-induced diabetes mellitus. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(7). [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00129-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00129-4)
- Moraes, V. R., Melo, M. O., & Maia Campos, P. M. B. G. (2023). Evaluation of Morphological and Structural Skin Alterations on Diabetic Subjects by Biophysical and Imaging Techniques. *Life*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/life13020579>
- Mostaço-Guidolin, L., Rosin, N. L., & Hackett, T. L. (2017). Imaging collagen in scar tissue: Developments in second harmonic generation microscopy for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081772>

- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2007). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5), 493–541. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>
- Natal, R. A., Vassallo, J., Paiva, G. R., Pelegati, V. B., Barbosa, G. O., Mendonça, G. R., Bondarik, C., Derchain, S. F., Carvalho, H. F., Lima, C. S., Cesar, C. L., & Sarian, L. O. (2018). Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast cancer. *Tumor Biology*, 40(4), 1–12. <https://doi.org/10.1177/1010428318770953>
- Nguyen, T. T., Gobinet, C., Feru, J., -Pasco, S. B., Manfait, M., & Piot, O. (2012). Characterization of type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: Identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. *Spectroscopy (New York)*, 27(5–6), 421–427. <https://doi.org/10.1155/2012/686183>
- Niczyporuk, M. (2018). Rat skin as an experimental model in medicine. *Progress in Health Sciences*, 8(2). <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.8351>
- Orgel, J. P. R. O., Persikov, A. V., & Antipova, O. (2014). Variation in the helical structure of native collagen. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089519>
- O'Sullivan, S., Medina, C., Ledwidge, M., Radomski, M. W., & Gilmer, J. F. (2014). Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: Biological and pharmacological significance NO and MMP-9 interactions. *Y Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Tom 1843, Bpoj 3). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.006>
- Ottani, V., Martini, D., Franchi, M., Ruggeri, A., & Raspanti, M. (2002). Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron*, 33(7–8). [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(02\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(02)00033-1)
- Paoli, J., Smedh, M., & Ericson, M. B. (2009). Multiphoton Laser Scanning Microscopy-A Novel Diagnostic Method for Superficial Skin Cancers. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 28(3), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2009.06.007>
- Parodi, V., Jacchetti, E., Osellame, R., Cerullo, G., Polli, D., & Raimondi, M. T. (2020). Nonlinear Optical Microscopy: From Fundamentals to Applications in Live Bioimaging. *Y Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Tom 8). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.585363>
- Paz, M. L., Cela, E. M., Friedrich, A. D., Weill, F. S., Leoni, J., & Maglio, D. H. G. (2014). Ultraviolet radiation effects on skin cells and immune system. *Y UV Radiation: Properties, Effects, and Applications*.
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Y Cell* (Tom 184, Bpoj 15). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Poole, J. J. A., & Mostaço-guidolin, L. B. (2021). Optical microscopy and the extracellular matrix structure: A review. *Y Cells* (Tom 10, Bpoj 7). <https://doi.org/10.3390/cells10071760>
- Prokopi, N., Andrikopoulos, K. S., Beobide, A. S., Voyiatzis, G. A., & Papachristou, D. J. (2021). Collagen orientation probed by polarized Raman spectra can serve as differential diagnosis

- indicator between different grades of meniscus degeneration. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99569-2>
- Rabasović, M. D., Pantelić, D. V., Jelenković, B. M., Ćurčić, S. B., Rabasović, M. S., Vrbica, M. D., Lazović, V. M., Ćurčić, B. P. M., & Krmpot, A. J. (2015). Nonlinear microscopy of chitin and chitinous structures: a case study of two cave-dwelling insects. *Journal of Biomedical Optics*, 20(01), 1. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.1.016010>
- Rastogi, K., Vashishtha, R., Shaloo, & Dan, S. (2022). Scientific advances and pharmacological applications of marine derived-collagen and chitosan. *Y Biointerface Research in Applied Chemistry* (Tom 12, Бpoj 3). <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.35403558>
- Reilly, D. M., & Lozano, J. (2021). Skin collagen through the lifestages: importance for skin health and beauty. *Y Plastic and Aesthetic Research* (Tom 8). <https://doi.org/10.20517/2347-9264.2020.153>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), 545–589. <https://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Roth, S., & Freund, I. (1981). Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon. *Biopolymers*, 20(6). <https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200613>
- Russell-Goldman, E., & Murphy, G. F. (2020). The Pathobiology of Skin Aging: New Insights into an Old Dilemma. *Y American Journal of Pathology* (Tom 190, Бpoj 7). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.03.007>
- Saini, R., Badole, S. L., & Zanwar, A. A. (2013). Arginine derived nitric Oxide: Key to healthy skin. *Y Bioactive Dietary Factors and Plant Extracts in Dermatology*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-167-7_8
- Schäffer, M. R., Tantry, U., Efron, P. A., Ahrendt, G. M., Thornton, F. J., & Barbul, A. (1997). Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: A possible pathophysiologic correlation. *Surgery*, 121(5). [https://doi.org/10.1016/S0039-6060\(97\)90105-7](https://doi.org/10.1016/S0039-6060(97)90105-7)
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability *Ann Rev Biochemistry*. *Annu Rev Biochem*, 78, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.COLLAGEN>
- Silva, S. A. M. e, Michniak-Kohn, B., & Leonardi, G. R. (2017). An Overview about Oxidation in Clinical Practice of Skin Aging. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(3), 367–374. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187206>
- Spanheimer, R. G., Umpierrez, G. E., & Stumpf, V. (1988). Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes*, 37(4). <https://doi.org/10.2337/diab.37.4.371>

- Stancic, A., Jankovic, A., Korac, A., Buzadzic, B., Otasevic, V., & Korac, B. (2018). The role of nitric oxide in diabetic skin (patho)physiology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 172, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.018>
- Stechmiller, J. K., Childress, B., & Cowan, L. (2005). Arginine supplementation and wound healing. *Y Nutrition in Clinical Practice* (Tom 20, Broj 1). <https://doi.org/10.1177/011542650502000152>
- Stone, N., Kendall, C., Smith, J., Crow, P., & Barr, H. (2004). Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discussions*, 126(1). <https://doi.org/10.1039/b304992b>
- Stylianou, A. (2017). Atomic force microscopy for collagen-based nanobiomaterials. *Journal of Nanomaterials*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9234627>
- Stylianou, A., Gkretsi, V., Patrickios, C. S., & Stylianopoulos, T. (2017). Exploring the nano-surface of collagenous and other fibrotic tissues with AFM. *Y Methods in Molecular Biology* (Tom 1627). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_29
- Stylianou, A., Kontomaris, S. V., Grant, C., & Alexandratou, E. (2019). Atomic force microscopy on biological materials related to pathological conditions. *Scanning*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8452851>
- Stylianou, A., Mpekris, F., Voutouri, C., Papoui, A., Constantinidou, A., Kitiris, E., Kailides, M., & Stylianopoulos, T. (2022). Nanomechanical properties of solid tumors as treatment monitoring biomarkers. *Acta Biomaterialia*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.10.021>
- Stylianou, A., Voutouri, C., Mpekris, F., & Stylianopoulos, T. (2021). *Pancreatic cancer collagen-based optical signatures*. <https://doi.org/10.1117/12.2582590>
- Su, J. W., Wang, Q., Tian, Y., Madden, L., Ling Teo, E. M., Becker, D. L., & Liu, Q. (2019). Depth-sensitive Raman spectroscopy for skin wound evaluation in rodents. *Biomedical Optics Express*, 10(12), 6114. <https://doi.org/10.1364/boe.10.006114>
- Su, P.-J., Chen, W.-L., Hong, J.-B., Li, T.-H., Wu, R.-J., Chou, C.-K., Chen, S.-J., Hu, C., Lin, S.-J., & Dong, C.-Y. (2009). Discrimination of collagen in normal and pathological skin dermis through second-order susceptibility microscopy. *Optics Express*, 17(13), 11161. <https://doi.org/10.1364/oe.17.011161>
- Tigges, J., Krutmann, J., Fritsche, E., Haendeler, J., Schaal, H., Fischer, J. W., Kalfalah, F., Reinke, H., Reifenberger, G., Stühler, K., Ventura, N., Gundermann, S., Boukamp, P., & Boege, F. (2014). The hallmarks of fibroblast ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 138(1). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2014.03.004>
- Tilbury, K., & Campagnola, P. J. (2015). Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 7, 21–32. <https://doi.org/10.4137/PMC.S13214>

- Tsafas, V., Gavgiotaki, E., Tzardi, M., Tsafa, E., Fotakis, C., Athanassakis, I., & Filippidis, G. (2020). Polarization-dependent second-harmonic generation for collagen-based differentiation of breast cancer samples. *Journal of Biophotonics*. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000180>
- Tsai, K. J., Dixon, S., Hale, L. R., Darbyshire, A., Martin, D., & de Mel, A. (2017). Biomimetic heterogenous elastic tissue development. *npj Regenerative Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0021-4>
- Van Gulick, L., Saby, C., Morjani, H., & Beljebbar, A. (2019). Age-related changes in molecular organization of type I collagen in tendon as probed by polarized SHG and Raman microspectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43636-2>
- Vasilijević, A., Buzadžić, B., Korać, A., Petrović, V., Janković, A., & Korać, B. (2007). Beneficial effects of L-arginine-nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan. *Journal of Physiology*, 584(3). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.140277>
- Williams, R. M., Zipfel, W. R., & Webb, W. W. (2005). Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophysical Journal*, 88(2), 1377–1386. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047308>
- Wittmann, F., Prix, N., Mayr, S., Angele, P., Wichmann, M. W., Van Den Engel, N. K., Hernandez-Richter, T., Chaudry, I. H., Jauch, K. W., & Angele, M. K. (2005). L-arginine improves wound healing after trauma-hemorrhage by increasing collagen synthesis. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*, 59(1), 162–168. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000171529.06625.A8>
- Wu, G., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Kim, S. W., Knabe, D. A., Li, P., Li, X., McKnight, J. R., Satterfield, M. C., & Spencer, T. E. (2011). Proline and hydroxyproline metabolism: Implications for animal and human nutrition. *Y Amino Acids* (Tom 40, Broj 4). <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-z>
- Yew, E., Rowlands, C., & So, P. T. C. (2014). Application of multiphoton microscopy in dermatological studies: A mini-review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 7(5). <https://doi.org/10.1142/S1793545813300103>
- You, S., Tu, H., Chaney, E. J., Sun, Y., Zhao, Y., Bower, A. J., Liu, Y. Z., Marjanovic, M., Sinha, S., Pu, Y., & Boppart, S. A. (2018). Intravital imaging by simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04470-8>
- Yu, H. B., Chen, S., Zhu, X. Q., Yang, H. Q., & Chen, J. X. (2011). Second harmonic generation imaging of dermal collagen component in human keloid tissue. *Journal of Physics: Conference Series*, 277(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/277/1/012046>
- Zhang, Z., de Munck, J. C., Verburg, N., Rozemuller, A. J., Vreuls, W., Cakmak, P., van Huizen, L. M. G., Idema, S., Aronica, E., de Witt Hamer, P. C., Wesseling, P., & Groot, M. L. (2019). Quantitative Third Harmonic Generation Microscopy for Assessment of Glioma in Human Brain Tissue. *Advanced Science*, 6(11). <https://doi.org/10.1002/advs.201900163>

Биографија аутора

Ирена Милер је рођена 10. септембра 1990. године у Београду, где је стекла основно и средњешколско образовање. Основне и мастер студије на Биолошком факултету у Београду, модул Биологија, мастер Професор биологије је завршила 2017. године. Одмах по завршетку мастер студија, уписује мултидисциплинарне докторске студије при Универзитету у Београду, програм Биофотоника. У периоду од јуна 2019. године до новембра 2020. године радила је као истраживач приправник у Одељењу за имунохемију и гликобиологију, Института за примену нуклеарне енергије (ИНЕП) у Београду. Од новембра 2020. до јануара 2022. године је била запослена у Лабораторији за атомску физику - Института за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију. Тренутно ради као истраживач сарадник Центра за биосистеме, на Институту Биосенс у Новом Саду. Као резултат рада на докторској дисертацији публикована су два рада у међународним часописима категорије М21 и М22.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Ирена Д. Милер _____

Број индекса _____ Б47/2017 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу –
корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ирена Д. Милер

Број индекса Б47/2017

Студијски програм Биофотоника

Наслов рада Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода

Ментори Др Александра Кораћ

Др Михаило Рабасовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структурне промене колагена у дермису коже пацова током старења и у дијабетесу – корелативна примена конвенционалних и напредних микроскопских метода

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.