

ГИДРОТЕРМИЧЕСКОЕ СОКРАЩЕНИЕ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ

© Л. В. Кухарева

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: kochka-0734@mail.ru*

Гидротермическое сокращение коллагенового волокна — резкое уменьшение его длины при нагревании в воде — является фазовым переходом первого рода, аналогичным плавлению. Теория зависимости напряжение—температура для плавления ориентированных полимерных систем под нагрузкой была развита Джи (Gee, 1947) и Флори (Flory, 1956); Флори была выведена равновесная зависимость напряжение—температура, при условии что расплавленный полимер является идеальным каучуком. Нами был предложен экспериментальный метод количественного исследования этого процесса, включающий в себя определение равновесных критических параметров перехода (критического напряжения и критической температуры), и исследовано влияние различных факторов на эти параметры. Необходимым условием определения критических параметров является предварительное дубление волокна. Было показано, что критическое напряжение гидротермического сокращения коллагенового волокна является важной количественной характеристикой, позволяющей судить о степени сохранности коллагеновой структуры и о степени ориентации молекул коллагена в волокне. Величину критического напряжения использовали для характеристики состояния структуры коллагена в различных системах: волокнах из кожи ископаемых экземпляров мамонта, из бычьих шкур, подвергнутых различным обработкам, и в различных искусственных коллагеновых волокнах. Температура начала гидротермического сокращения дубленого коллагена (так называемая температура сваривания) хотя и не является равновесной величиной, традиционно используется для характеристики степени дубления образцов кожи и иных коллагеновых структур; было показано, что она зависит также от наличия на нативных коллагеновых волокнах неколлагеновой оболочки.

Ключевые слова: коллагеновые волокна, сухожилия крысиного хвоста, гидротермическое сокращение, зависимость напряжение—температура, равновесное плавление, критические параметры, критическое напряжение.

Коллаген является основным структурным белком соединительной ткани, образующим ее опорный каркас и составляющим для млекопитающих около трети всех белков организма. Основным элементом всех опорных структур организма является коллагеновая фибрillла, состоящая в большинстве случаев из коллагена типа I — наиболее распространенного фибрillлярного коллагена, причем в фибрилле палочкообразные фибрillлярные молекулы уложены параллельно оси фибриллы со сдвигом на 1/4 своей длины (Linsenmayer, 1981); в поперечной упаковке молекул в фибрилле и нативном коллагеновом волокне также существует упорядоченность, и фибрillла, таким образом, является биологическим паракристаллом и дает характерную рентгенограмму как в меридиональном (вдоль оси волокна), так и в экваториальном (поперек этой оси) направлениях, а также обладает сильным положительным одноосным двойным лучепреломлением с оптической осью, направленной вдоль оси волокна (Bang, 1966). При нагревании нативного коллагенового волокна в воде при определенной температуре оно резко сокращается до 1/4—1/5 первоначальной длины; это явление получило название гидротермического сокращения или сверхсокращения. Гидротермическое сверхсокращение известно с 1802 г., но только позднее (Wright, Wiederhorn,

1951; Bear, 1952) было показано рентгенографически, что оно является фазовым переходом первого рода, аналогичным плавлению, так как при этом исчезают как меридиональная, так и экваториальная рентгеновские упорядоченности и заменяются аморфным гало; двойное лучепреломление волокон также при этом исчезает.

При растяжении сокращенного волокна меридиональная (но не экваториальная) рентгеновская картина и двупреломление частично восстанавливаются (Kukhareva et al., 1970; Михайлов, 1980). Если закрепить волокно по концам, оно развивает напряжение, которое можно измерить.

Теория плавления ориентированных полимерных систем под нагрузкой была разработана Джи (Gee, 1947) и Флори (Flory, 1956). Ими было выведено для равновесных условий уравнение

$$[d(f/T)/d(1/T)] p = \Delta H / \Delta L,$$

где f — приложенная к волокну однородная растягивающая сила, T — абсолютная температура, p — давление, ΔH и ΔL — соответственно изменения энталпии и длины при плавлении; это уравнение аналогично уравнению Клаузиуса—Клапейрона, связывающему равновесную

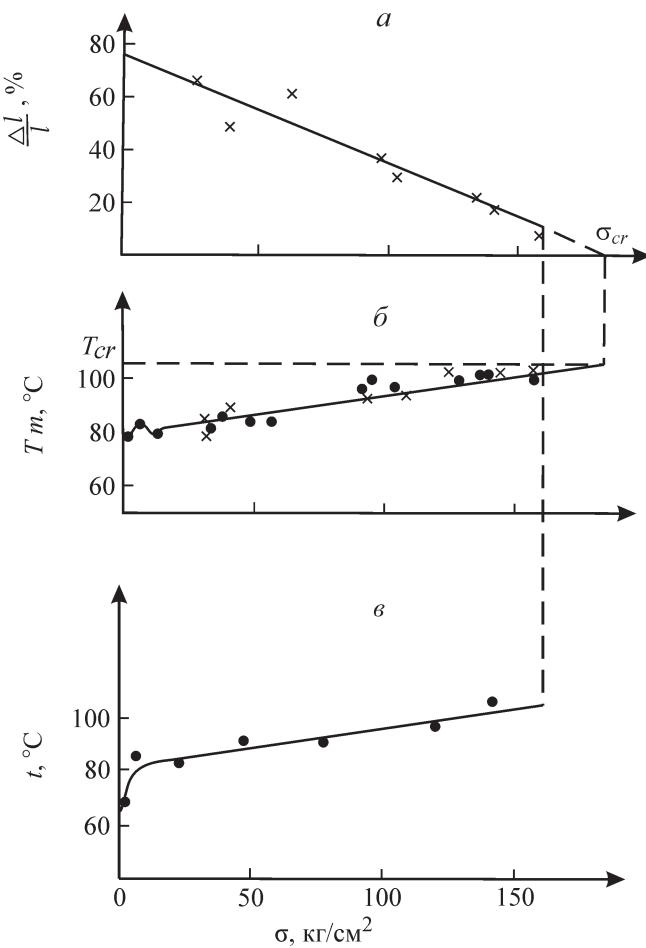


Рис. 1. Определение критических параметров гидротермического сокращения коллагена.

а — экстраполяция величин относительного сокращения к его нулевому значению и определению σ_{cr} (по: Kukhareva et al., 1970); *б* — совпадение изометрических и изотонических данных и определение T_{cr} ; *в* — экспериментальная кривая изометрического нагрева. Пояснения см. в тексте.

температуру, давление, объем системы и теплоту перехода при испарении жидкостей. Флори (Flory, 1956) проинтегрировал это уравнение и получил зависимость равновесной силы f от равновесной температуры плавления T_m , считая расплавленный полимер идеальным каучуком и длину расплавленного образца близкой к его длине в кристаллическом состоянии; набухание полимера при этом не учитывалось

$$f / T_m = 3kv n / L_m \left[L_c / L_m \pm \sqrt{2 / 3R \int_{T_m}^{T_{cr}} \Delta h d(l / T_m)} \right], \quad (1)$$

где v — число единичных полимерных цепей между сшивками, n — число статистических сегментов в такой цепи, L_c — длина волокна в кристаллическом состоянии, L_m — длина волокна при максимальном растяжении, T_{cr} — критическая температура плавления волокна, т. е. его температура плавления при длине, равной длине волокна в кристаллическом состоянии, Δh — теплота плавления на 1 моль статистических сегментов полимерной цепи, l — длина статистического сегмента цепи, k — по-

стоянная Больцмана, R — газовая постоянная. Взяв интеграл под радикалом, Флори получил окончательно

$$\sigma / T_m = 3ku / l [L_c / L_m \sqrt{2\Delta h / 3R (1/T_m - 1/T_{cr})}], \quad (2)$$

где σ — приложенное напряжение (сила на единицу поперечного сечения волокна), l — длина статистического сегмента цепи, u — число полимерных цепей на единицу поперечного сечения сухого полимерного волокна, T_m — равновесная температура плавления волокна, k — постоянная Больцмана, R — газовая постоянная. Из-за принятых при интегрировании ограничений Флори (Flory, 1956) считал это уравнение приблизительным и пригодным лишь для иллюстративных целей. Флори в этой работе также было показано, что введение в ориентированную кристаллическую полимерную систему сшивок повышает температуру плавления волокна, уменьшая энтропию расплавленной системы. Сшивка в аморфном состоянии беспорядочного клубка, напротив, понижает температуру плавления. Таким образом, было теоретически обосновано использование в кожевенной промышленности и во всех случаях, когда надо охарактеризовать или сравнить степень сшивки коллагеновых структур (например, обработанных глутаральдегидом медицинских коллагеновых материалов), температуры сокращения (так называемой температуры сваривания) дубленых коллагеновых структур для оценки степени дубления. При этом следует отметить, что температура сваривания, при какой бы малой скорости нагрева она ни измерялась, не является равновесной температурой плавления, но сильно ее превышает, иногда на 10 °С и более. Измерение истинной температуры плавления достаточно сложно и требует экстраполяции нескольких равновесных температур плавления в начале кривой напряжение—температура к нулевому напряжению (Flory, Spurr, 1961). Считая, согласно теории Флори, расплавленный коллаген идеальным каучуком, можно, измеряя напряжение в растянутом расплавленном коллагене, определить в нем расстояние между сшивками, т. е. плотность сшивок (Wiederhorn, Reardon, 1952). Для точной характеристики степени дубления коллагена этим методом и пользуются (см., например, Kronick et al., 1990).

Измерение механики гидротермического сокращения коллагена возможно в двух режимах — изометрическом и изотоническом. В изометрическом режиме измеряется напряжение, развиваемое закрепленным по концам волокном при плавлении в зависимости от температуры; в изотоническом измеряется зависимость длины волокна от температуры при фиксированном внешнем напряжении. При этом необходимо дополнительное дубление нативных коллагеновых волокон, так как имеющиеся в них ковалентные сшивки термолабильны (Никитин и др., 1977) и при нагревании волокно начинает расползаться и за счет разрыва сшивок, и за счет частичного растворения волокна в воде. Обычно такое дубление производят растворами формалина или парабензохинона; парабензохиноновое дубление дает более термостойкие сшивки.

Нами (Френкель и др., 1965; Kukhareva et al., 1970) было показано (рис. 1), что в серии изотонических кривых для дубленых формалином сухожилий крысиного хвоста температуры начала сокращения повышаются с увеличением нагрузки и ложатся на изотоническую кривую напряжение—температура; экстраполяцией величин сокращения к нулевому сокращению можно определить

критическое напряжение, являющееся по определению напряжением, развиваемым расплавленным волокном при длине, равной длине кристаллического образца. При этом величина критического напряжения является термодинамически равновесной, поскольку величины сокращения при их измерении остаются постоянными достаточно долго (при условии введения в волокно термостойких шпилек). Поскольку наблюдается эквивалентность внутреннего (изометрия) и внешнего (изотоника) напряжений, можно считать изометрическую кривую кривой фазового равновесия и определить критическую температуру перехода экстраполяцией этой кривой к $T = T_{cr}$ (рис. 1, б).

Впоследствии нами (Kukhareva, Vorob'ev, 1981) было экспериментально показано (в согласии с теоретическими предсказаниями (Flory, Spurr, 1961)), что изометрическая кривая, даже снятая при небольших скоростях нагрева ($0.3—0.5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), не является равновесной, так как для равновесия необходимо сосуществование участков аморфной и кристаллической фаз по всей длине волокна и поэтому в каждой температурной точке необходимо слегка уменьшать длину волокна, чтобы создать эти зоны и выдерживать систему при данной температуре достаточно долго. Изометрическая кривая с небольшим предварительным плавлением образца также в своем начальном участке не совпадает с равновесной (рис. 2). Нами была впервые рассчитана кривая плавления коллагенового волокна по уравнению (2) с использованием молекулярных констант коллагена в растворе и в нативной коллагеновой фибрилле и показано (рис. 2), что в пределах точности определения параметра u — числа полимерных цепей на единицу площади сухого полимерного волокна — она совпадает с экспериментальной равновесной кривой плавления сухожилия крысиного хвоста, дубленного парамбензоином. Таким образом, уравнение (2), несмотря на принятые при интегрировании допущения, достаточно точно описывает плавление коллагеновой фибриллы в воде.

Являющаяся термодинамически равновесной величина σ_{cr} определяется достаточно легко — экстраполяцией серии изотонических кривых к нулевому сокращению; от скорости нагрева величина сокращения при изотонических измерениях также не зависит (Kukhareva, Vorob'ev, 1981). Определение равновесной величины T_{cr} требует снятия равновесной кривой плавления, что занимает много времени и требует устойчивости шпилек и самого полимерного волокна в горячей воде. В работах Кухаревой и соавторов (1987а, 1987б) мы рассмотрели теоретически и экспериментально влияние различных факторов на величины σ_{cr} и T_{cr} . Введя в уравнение (1) зависимость теплоты плавления от набухания полимера, взяв интеграл под радиусом и учитя ряд тепловых характеристик набухания коллагена в воде, мы получили для $T = T_{cr}$ уравнение

$$\sigma_{cr} = 3kuL_cT_{cr}/1L_m \quad (3)$$

и независимое уравнение для T_{cr}

$$T_{cr} = \frac{1}{1/T_i - (L_c - L_m)2 \cdot (3R/2\Delta h)}, \quad (4)$$

где T_i — температура плавления ненагруженного волокна. Для частично кристаллического и не полностью ориентированного волокна длина кристаллического волокна

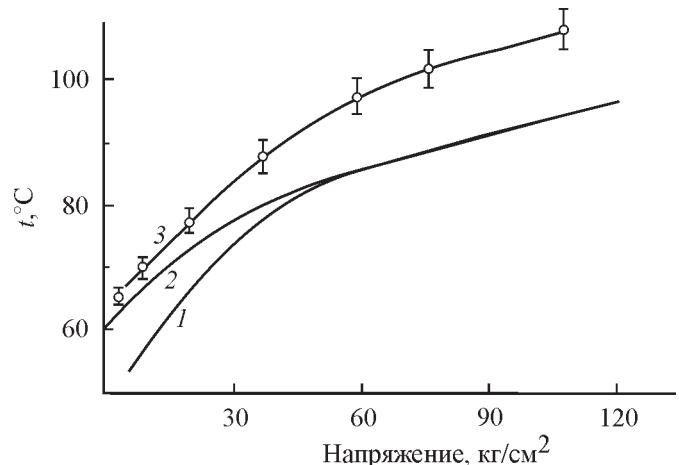


Рис. 2. Сравнение расчетных и экспериментальных зависимостей напряжение — температура для плавления дубленных парамбензоином коллагеновых волокон в воде (по данным: Kukhareva, Vorob'ev, 1981).

1 — экспериментальная равновесная кривая плавления; 2 — изометрическая кривая с небольшим предварительным плавлением, снятая при скорости нагрева 0.3 град/мин; 3 — кривая, рассчитанная по уравнению (2). Пояснения см. в тексте.

L_c заменяется длиной волокна до плавления L'_c , которую можно представить как (Samuels, 1975)

$$L'_c = l_cf_c \lambda + l_af_a(1 - \lambda), \quad (5)$$

где f_c, f_a и l_c, l_a — соответственно функции ориентации и удельные длины кристаллической и аморфной частей волокна, λ — степень кристалличности L'_c — общая длина частично кристаллического образца. От степени ориентации в уравнениях (3) и (4) зависят величины L'_c и $\lambda \cdot L'_c$ при увеличении степени ориентации растет (уравнение 5). Плотность упаковки λ также растет с увеличением степени ориентации, так как уменьшается средняя площадь проекции макромолекулы на плоскость попечерного сечения; она растет также при увеличении содержания коллагена в волокне. Согласно уравнениям (3) и (4), величины σ_{cr} и T_{cr} при этом также должны увеличиваться. Критическое напряжение может, следовательно, быть мерой ориентации волокна и содержания в нем коллагена. Неравновесным аналогом критического напряжения для недостаточно сшитых коллагеновых волокон является максимальное напряжение изометрического нагрева; для целей сравнения можно пользоваться и им. От степени сшивки из величин, входящих в уравнения (3) и (4), зависит только T_i ; она возрастает при увеличении степени сшивки, но для коллагена не сильно (Flory, Spurr, 1961). При этом, согласно уравнению (4), должна слабо увеличиваться T_{cr} , а следовательно (уравнение 3), и σ_{cr} .

Экспериментальное применение гидротермического сокращения коллагеновых волокон для сравнительного исследования коллагеновых структур на недубленых образцах началось в 1920-е годы с серии работ Верцара (см. обзор: Verzar, 1963) и продолжалось до 1980-х годов (Vividik, 1977; Allein et al., 1978, и др.). Исследовались изометрия или изотоника недубленых сухожилий или полосок кожи, которые быстро расползались при нагревании, и сравнивались величины максимального напряжения и времени до его падения, т. е. фактически исследовались от-

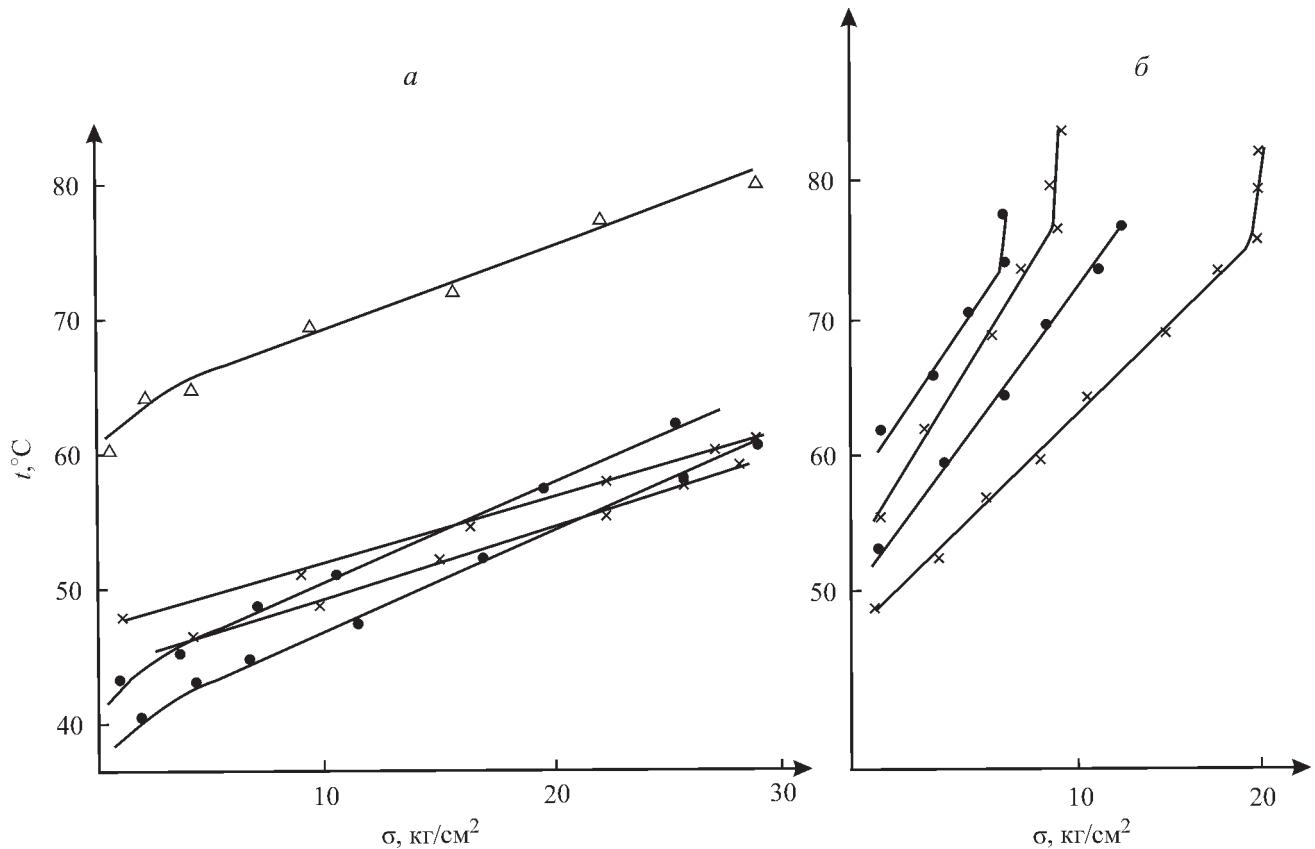


Рис. 3. Изометрические кривые для волокон кожи ископаемых экземпляров мамонта.
а — хатангский мамонт, б — магаданский мамонтенок. Скорость нагрева 0.8 град/мин.

носительное количество и термостабильность сшивок в структуре; для этого такие исследования обычно и предпринимались. На кривых напряжение—температура или напряжение—время при постоянной температуре (выше точки плавления волокна) наблюдался максимум, высота которого и время существования при определенной температуре позволяли судить о количестве и термостойкости сшивок в зависимости от различных факторов, например возраста животного. К тому же при измерении волокно частично растворялось в воде (Viidik, 1977), так что ни о каком равновесии речи не шло. Часть сшивок в нативной коллагеновой фибрилле можно стабилизировать восстановлением борогидридом натрия (Allein et al., 1978), но систематических количественных исследований гидротермического сокращения обработанных таким образом коллагеновых волокон не приводилось.

Нами были получены следующие величины критического напряжения и критической температуры для сухожилий крысиного хвоста, дубленных формалином и парабензохиноном: 165 кг/см², 106 °С и 185 кг/см², 107.5 °С соответственно (Kukhareva et al., 1970; Kukhareva, Vorob'ev, 1981). Мнускиной с сотрудниками (1969) для коллагеновых волокон из дермы крупного рогатого скота, прошедшей обработку кислотами и известью, но не дубленных дополнительно, была получена величина критического напряжения 76.5 кг/см²; возможно, однако, что дубление ионами кальция было недостаточно стойким, так как длительному нагреву волокно не подвергалось.

Используя метод гидротермического сокращения, мы исследовали сохранность коллагеновых волокон кожи нескольких ископаемых экземпляров мамонта (Кухарева,

Ибрагимов, 1981). Образцы кожи размачивали в физиологическом растворе, затем извлекали, промывали водой и сушили коллагеновые фибриллы. Дубление парабензохиноном и формалином и снятие изометрических и изотонических кривых производили в физиологическом растворе со скоростью нагрева 0.8 °С/мин. Фибриллы исследовали также рентгенографическим и поляризационно-оптическим методами. Фибриллы сохраняли близкую рентгеновскую периодичность, что свидетельствует о целости тройной спирали, а под поляризационным микроскопом обнаруживали картину, очень похожую на ту, которую дает нативное сухожилие крысиного хвоста, — сильное двупреломление, ориентированное вдоль оси волокна с сохранением так называемого кримпа — характерной волнистости укладки микрофибрill коллагена в фибриллу (Diamant et al., 1972). На рис. 3 изображены изометрические кривые для коллагеновых волокон кожи гигантского мамонта и магаданского мамонтенка. Видно, что дубление парабензохиноном не меняет характера кривых, и только дубление формалином увеличивает степень сшивки в коллагеновых волокнах из кожи хатангского мамонта; поскольку парабензохинон взаимодействует с боковыми группами тройной спирали (Flory, Spurr, 1961), следует полагать, что они в процессе мумификации модифицировались или стали труднодоступными. Максимума напряжения на кривых также не наблюдается, т. е. волокна в коже уже имеют достаточное количество сшивок, вероятно за счет действия многовалентных катионов почвенных вод. Величины критических напряжений составляют 41 кг/см² для кожи хатангского мамонта, 50—52 кг/см² — для магаданского мамонтенка и

Таблица 1

Влияние условий вытяжки коллагеновых монофиламентов на их критические параметры

Номер серии	Номер образца	Фильтрная вытяжка, %	Пластификационная вытяжка, %		Суммарная вытяжка, %	σ_{cr} , кг/см ²	T_{cr} , °C
			в пластификационной ванне	в дубящей ванне			
1	1	0	Нет обработки	5	5	46.1	103
	2	10			15	50.0	100
	3	30			35	46.1	99
2	1	0	0	5	5	32.4	101
	2	10			15	37.3	101
	3	30			35	48.0	101
3	1	0	5	5	10	53.0	112
	2	10			20	50.0	110
	3	30			40	65.7	120
4	1	0	0	15	15	50.0	103
	2	10			25	51.0	102
	3	30			45	60.8	111
5	1	0	10	10	20	49.0	107
	2	10			30	69.6	107
	3	30			50	73.5	111
Сухожилие крысиного хвоста				5		107.9	109

Примечание. Дубление всех образцов производили в дубящей ванне с основностью хромосомного комплекса 39 и концентрацией Cr_2O_3 2 % в течение 16 мин.

50 кг/см² — для кожи чучела азиатского слона (сделанного в начале XIX в., шкуру обрабатывали квасцами), взятой для сравнения; для сравнения также можно привести величину критического напряжения для коллагеновых волокон из дермы бычьих шкур, обработанных слабыми кислотами и известью, — 76.5 кг/см² (Мнускина и др., 1969).

Сохранность структуры коллагеновых волокон у магаданского мамонтенка оказалась лучшей, чем у хатангского мамонта, хотя коллагеновые фибриллы более молодых животных обычно дают на изометрических кривых гидротермического сокращения меньшие напряжения. Вероятно, это объясняется условиями хранения — труп магаданского мамонтенка был почти сразу же заморожен, а образцы кожи хатангского мамонта долго хранились при температуре от нулевой до комнатной. Для хатангского мамонта исследовали волокна из кожи хобота, ноги и щеки, и только волокна из кожи хобота могли быть исследованы методом гидротермического сокращения, так как остальные не имели никакой прочности и рвались даже под минимальной нагрузкой, хотя поляризационно-оптическая картина сохранилась.

Мы проверяли также экспериментально влияние степени ориентации и степени дубления искусственных коллагеновых волокон на величины их критического напряжения и критической температуры (Френкель и др., 1978; Кухарева и др., 1987б). Исследовали коллагеновые монофиламенты (Кухарева и др., 1987а, 1987б) и полифиламенты, полученные прядением через фильтр со многими отверстиями раствора коллагена, полученного щелочно-солевым методом (Френкель и др., 1978). Полифиламенты получали методом сухого прядения через фильтр с одним отверстием из солянокислой коллагеновой пасты с концентрацией коллагена 8—10 % и pH 3.0—3.2; для

получения пасты дерма крупного рогатого скота проходила крио- и щелочно-солевую обработку (Васильев, Вольф, 1990). Показано, что у полученных монофиламентов сохраняется рентгенографический близкий порядок, но не типичная полосатая электронно-микроскопическая картина нативной коллагеновой фибриллы (Васильев, Вольф, 1990), и их можно считать ориентированной частично кристаллической системой. Волокна подвергали фильтрной (сразу после выхода из фильтра) и пластификационной вытяжке, пластификационная вытяжка проходила или в пластификационной ванне, содержащей 10%-ный раствор Na_2SO_4 , pH которого был доведен до 11 раствором NH_4OH , или в дубящей ванне. Дубление производили солями хрома — хромсульфатным комплексом различной концентрации и степени основности (число основности хромового комплекса — процентное отношение числа эквивалентов кислоты в комплексе к числу эквивалентов хрома) (Михайлов, 1971). Изометрические и изотонические кривые снимали при скорости нагрева 0.6—0.8 °C/мин. Сшивки были стойкими, напряжение на изометрических кривых не падало, но наблюдалась небольшая потеря массы волокон, что делало невозможным снятие равновесных кривых плавления. Величины T_{cr} являются, таким образом, неравновесными и приближенными. Предварительно ориентация волокон разной степени вытяжки была качественно исследована поляризационно-оптическим методом (Кухарева и др., 1982).

Данные по влиянию степени ориентации на критические параметры волокон приведены в табл. 1. Видно, что внутри каждой серии величины критического напряжения возрастают с ростом общей величины вытяжки; это следует и из поляризационно-оптических данных (Кухарева и др., 1982). Для 2-й серии величины критического

Таблица 2

Влияние степени дубления на критические параметры искусственных коллагеновых монофиламентов

Номер образца	Основность хромового комплекса, %	Концентрация Cr ₂ O ₃ , %	Время дубления, ч	T _s , °C	σ _{cr} , кг/см ²	T _{cr} , °C
1	1	0.5	1	62.8	31.4	80.0
2	18	2.0	1	74.5	31.4	94.5
3		5.0	1	83.5	43.6	98.0
4		40.0	1	90.0	29.4	107.0
5		0.5	48	81.0	23.7	102.5
6	39	0.5	1	70.0	43.2	96.0
7		2.0	1	85.5	45.1	103.0
8		5.0	1	90.5	41.2	104.0
9		40.0	1	81.0	50.0	113.0
10		0.5	48	75.0	35.3	114.0
11		2.0	48	85.0	35.3	109.0
12		5.0	48	85.0	40.2	111.0
13	48	0.5	1	62.5	37.3	92.0
14		2.0	1	71.5	41.2	96.0
15		5.0	1	890.5	44.1	102.0
16		10.0	1	91.5	34.3	103.0
17		20.0	1	90.0	33.3	103.0
18		40.0	1	87.0	34.3	104.0
19		0.5	48	82.0	38.2	112.0
20		20.0	48	94.0	16.7	100.0

Примечание. Волокна не подвергали ни фильтрной, ни пластикационной вытяжке. Дубление производили в колбе при 20 °C, после чего волокна промывали водой и сушили.

напряжения ниже других серий и для 4-й серии не выше 3-й, несмотря на большую суммарную вытяжку, очевидно из-за того, что пластикационная ванна несколько дезориентирует структуру волокна и для хорошей ориентации необходимо сочетание вытяжки в пластикационной и дубящей ваннах. Наивысшей ориентацией обладает образец 3 из серии 5, что подтверждается и поляризационно-оптическими данными, и он обнаруживает наивысшую величину критического напряжения, которая тем не менее в полтора раза меньше величины критического напряжения для дубленного таким же образом с растяжением на 5 % в дубящей ванне сухожилия крысиного хвоста. Величины критического напряжения (неравновесные) возрастают таким же образом, только слабее. Таким образом, критическое напряжение и критическая температура, как и следует из теории, возрастают со степенью ориентации. Полученный указанный растянутый монофиламент, таким образом, является ориентированным коллагеновым искусственным волокном, все же сильно уступающим по ориентации нативной структуре. Коллагеновый полифиламент (Френкель и др., 1978) хотя также сохраняет рентгеновские рефлексы ближнего порядка, имеет величину критического напряжения 45 кг/см² при таком же дублении и, таким образом, еще менее упорядоченную структуру, чем максимально вытянутый монофиламент.

Данные по влиянию степени дубления монофиламентов на величины их критических параметров приведены в табл. 2. Видно, что с ростом степени дубления (с повышением концентрации хромового комплекса при постоянных числе основности и времени дубления; показателем степени дубления является начальная температура сокращения T_s) σ_{cr} и T_{cr} немногого увеличиваются, как и следует из теории. Исключение составляют образцы 4 и 16—18, где дубление проходит медленнее из-за особенностей структуры хромового комплекса, вызываемых его очень высокой концентрацией (40 %) или сочетанием высокой основности комплекса (48) с высокими его концентрациями (Михайлов, 1971). Для образца 20 величина σ_{cr} аномально низка, по-видимому из-за высокой величины напряжений, при которой можно получить лишь начало изометрической кривой. Таким образом, эксперимент подтверждает теоретические выводы о влиянии степени ориентации и степени дубления на критические параметры искусственных коллагеновых волокон.

Наконец, мы показали, что для нативных сухожилий (крысиного хвоста) наличие оболочки сухожилия и ее взаимодействие с дубителем могут дополнительно повышать начальную неравновесную температуру сокращения T_s и увеличивать разницу между T_s и T_m — равновесной температурой плавления (Кухарева, Воробьев, 1981). Сухожилия хвоста млекопитающих имеют наружную оболочку, отличную от коллагеновой (Kwon et al., 1964; Ballan, Bowes, 1967). При ее механическом удалении с сухожилий хвоста кенгуру T_s снижается; у крысих сухожилий оболочка тоньше и плотно прилегает к волокну (Kwon et al., 1964); с возрастом животного оболочка сухожилия утончается (Jordan-Lloyd, Mariott, 1935; Theis, 1946). Воспользовавшись тем фактом (Jordan-Lloyd, Mariott, 1935), что при pH 2 наблюдается разделение сухожилий крысиного хвоста на 2—4 волокна, причем набухание

Таблица 3

Влияние оболочки сухожилия на неравновесную температуру сокращения дубленных парабензоином сухожилий хвостов крыс

Возраст крыс, мес	Режим обработки сухожилий	T _s , °C	T _m , °C	T _s —T _m , °C
17.0	—	57.90	57.9	0
	II	60.90	60.6	0.3
7.0	—	57.03	55.0	2.0
	I	53.30	52.7	0.6
3.5—4.0	II	56.50	51.0	1.5
	—	58.60	49.5	9.1
	I	53.10	47.2	5.9
2.5	II	55.30	49.5	5.8
	—	57.90	51.0	6.9
	II	54.60	48.2	6.4
Искусственные коллагеновые монофиламенты	—	39.80	39.9	0

Примечание. Сухожилия извлекли в 0.154 М раствор NaCl, промывали и хранили в нем. Для снятия оболочек сухожилия обрабатывали 0.1 М цитратным буфером, доведенным NaCl до общей ионной силы 0.154 М (режим I) или 0.5 М (режим II), затем слегка отжимали, нейтрализовали, отмывали 0.154 М NaCl и хранили в нем.

волокна в точке pH 2 меньше, чем в ее окрестностях, мы попытались таким образом удалить или повредить оболочку сухожилий хвоста крыс различного возраста. Измерения производили в 0.154 М растворе NaCl со скоростью нагрева 0.1—0.3 °C/мин. T_m и T_s определяли экспериментальной к нулевому напряжению нескольких начальных точек равновесной (Kukhareva, Vorob'ev, 1981) и неравновесной изометрии. В качестве контроля исследовали такие же коллагеновые монониты, как в работах Кухаревой с соавторами (1987а, 1987б), дубленные так же, как сухожилия; на них не могло быть никакой оболочки.

Результаты представлены в табл. 3. Видно, что действительно разница между T_m и T_s для сухожилий снижается с ростом возраста крысы и что ее нет для необработанных сухожилий 17-месячных крыс и для искусственных мононитов, а разрыхление оболочки кислым буфером уменьшает разницу между T_s и T_m . Кислая обработка несколько снижает величину T_m , вызывая набухание и разрыхление структуры; режим II вызывает меньшее набухание и меньше повреждает структуру, но и менее эффективен. Таким образом, большая разница между T_s и T_m для нативных коллагеновых фибрill объясняется, по-видимому, не только проведением процесса плавления в неравновесных условиях, но и наличием на волокне оболочки неколлагеновой природы, и при точных измерениях этот факт нужно учитывать.

Список литературы

- Васильев М. П., Вольф Л. А. 1990. Биологически активные коллагеновые волокна и волокнистые материалы. Химические волокна. 6 : 39—41.
- Кухарева Л. В., Воробьев В. И. 1981. Влияние оболочки сухожилий хвостов крыс на их термическое сокращение в физиологическом растворе. В кн.: Биомеханика кровообращения, дыхания и биологических тканей. Рига: Зинатне. 277—282.
- Кухарева Л. В., Ибрагимов Р. Х. 1981. Некоторые сравнимые характеристики коллагеновых волокон кожи двух исконаемых экземпляров мамонта. В кн.: Магаданский мамонтенок. Л.: Наука. 105—115.
- Кухарева Л. В., Хануков Л. А., Васильев М. П. 1982. Поляризационно-оптическое исследование искусственных коллагеновых мононитов. В кн.: Волокна, волокнистые и пленочные материалы со специальными свойствами. Л.: Ленинградский текстильный институт им. С. М. Кирова (депонировано). Реферат в кн.: Библиографический указатель ВИНИТИ «Депонированные рукописи». 12 : 112.
- Кухарева Л. В., Хануков Л. А., Воробьев В. И. 1987а. Влияние степени ориентации и степени дубления коллагеновых волокон на напряжение, развиваемые ими при плавлении в воде. Теория. Деп. в ВИНИТИ. 7251-В-87.14.10.87.
- Кухарева Л. В., Хануков Л. А., Воробьев В. И. 1987б. Влияние степени ориентации и степени дубления коллагеновых волокон на напряжение, развиваемые ими при плавлении. Экспериментальные данные. Деп. в ВИНИТИ. 7252-В-87.14.10.87.
- Михайлов А. М. 1980. Химия и физика коллагена кожного покрова. М.: Легкая индустрия. 232 с.
- Михайлов А. М. 1971. Коллаген кожного покрова и основы его переработки. М.: Легкая промышленность. 525 с.
- Мнускина Н. В., Кутын В. А., Михайлов А. Н. 1969. Влияние кислотной обработки на свойства голья. Кожевенная промышленность. 1 : 1—5.
- Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская Л. А. 1977. Возрастная биохимия коллагеновых структур. Киев: Наукова думка. 279 с.
- Френкель Л. С., Кухарева Л. В., Васильев М. П., Воробьев В. И. 1978. Исследование структуры искусственных коллагеновых волокон. В кн.: Химия и химическая технология в текстильной промышленности. Межвузовский сб. ЛТИ им. Ленситета. 6—10.
- Френкель С. Я., Кухарева Л. В., Гинзбург Б. М., Гаспарян К. А., Воробьев В. И. 1965. Фазовая диаграмма коллагена и интерпретация теплоты перехода порядок—беспорядок в воде. Биофизика. 10 (5) : 735—742.
- Allain J. S., Le Lous M., Bazin S., Bailey A. J., De Launay A. 1978. Isometric tension developed during heating of collagenous tissues. Relationships with collagen cross-links. Biochim. biophys. acta. 533 : 147—155.
- Balian G. A., Bowes J. H. 1967. Composition of membrane tissues obtained from tendon and skin. Nature. 213 : 518—519.
- Banga I. 1966. Structural and function of elastin and collagen. Budapest: Akadem. Kiado. 225 p.
- Bear R. S. 1952. The structure of collagen fibrils. Adv. Prot. Chem. 7 : 69—160.
- Diamant J., Keller A., Baer E., Litt M., Arridge R. G. C. 1972. Collagen, ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. Proc. Roy. Soc. Lond. 13 : 293—315.
- Flory P. J. 1956. Theory of elastic mechanisms in fibrous proteins. J. Amer. Chem. Soc. 78 : 5222—5235.
- Flory P. J., Spurr O. K. 1961. Melting equilibrium for collagen fibers under stress. J. Amer. Chem. Soc. 83 : 1308—1316.
- Gee G. 1947. Some thermodynamic properties of high polymers and their molecular interpretation. Quart. Rev. 1 : 265—298.
- Jordan-Lloyd D., Mariott R. H. 1935. The swelling of structured proteins: the influence of the reticular tissue on the swelling of collagen in water and hydrochloric acid. Proc. Roy. Soc. B118 (810) : 439—445.
- Kronick P. L., Cooke P., Maleeff B. 1990. Glutaraldehyde cross-linking of the sheath-core structures in collagen fibrils of skin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 580 : 448—449.
- Kukhareva L. V., Frenkel S. Ya., Ginzburg B. M., Vorob'ev V. I. 1970. Influence of load on order-disorder transitions in native collagen fibers. Biorheology. 7 : 37—53.
- Kukhareva L. V., Vorob'ev V. I. 1981. The order-disorder transitions in fibrillar proteins. Stress-temperature dependence of hydrothermal contraction of the native collagen fibers. Biorheology. 18 : 601—618.
- Kwon D. S., Mason P., Rigby B. J. 1964. Influence of the tendon membrane on swelling and thermal stability. Nature. 201 : 159—160.
- Linsenmayer T. F. 1981. Collagen. In: Cell biology of extracellular matrix. New York; London: Plenum Press. 515 p.
- Samuels R. J. 1975. Quantitative structural characterization of the melting behavior of isotactic polypropylene. J. Polym. Sci. Polymer. Physics. Ed. 13 : 1417—1446.
- Theis E. R. 1946. Relation of swelling to shrinkage temperature of collagen. Trans. Faraday Soc. 42B : 243—244.
- Verzar F. 1963. Differenzierung verschiedener Vernetzungsnester (Crosslinks) des Collagens durch Spannung-messungen. Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem. 335 : 38—52.
- Viidik A. 1977. Thermal contraction—relaxation and dissolution of rat tendon collagen in different ages. Akt. Gerontol. 7 : 493—498.
- Wiederhorn N. M., Reardon G. G. 1952. Studies concerned with the protein of collagen. II. Stress-strain behavior of thermally contracted collagen. J. Polym. Sci. 9 : 315—325.
- Wright B. A., Wiederhorn N. M. 1951. Studies concerned with the structure of collagen. I. An X-ray investigation of the denaturation of collagen. J. Polym. Sci. 7 : 105—120.

THE HYDROTHERMAL CONTRACTION OF COLLAGEN FIBERS
AS A METHOD OF ITS STRUCTURE INVESTIGATION

L. V. Kukhareva

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: kochka-0734@mail.ru

The hydrothermal contraction of collagen fibers, that is sharp decrease of the fiber length in the narrow temperature range during their heating in water, is a typical example of phase transition which is analogous to melting. General thermodynamic consideration of the melting of oriented polymer fibers was carried out by Gee (1947) and Flory (1956). Flory derived and equilibrium dependence of force on temperature considering the melted polymer as an ideal rubber. We proposed an experimental method for quantitative investigation of this process including estimation of two critical parameters, which are the critical tension and the critical temperature. The necessary condition for the critical parameters estimation is the prior cross-linking of the fiber. We studied theoretically and by experiment the influence of different factors on these critical parameters. We demonstrated the critical tension of hydrothermal collagen contraction to be an important characteristic making possible the estimation of native collagen structure retaining and molecular orientation's degree. The critical tension value was used do advantage for the collagen structure characteristic in some mammoth fossils skin, in bovine skin in the process of leather manufacture and in artificial collagen fibers. The initial temperature of hydrothermal collagen contraction, what is known as shrinkage temperature using widely for the collagen tannage estimation, was shown to be dependent on the occurrence of non-collagenous sheath on native collagen fibers.

Key words: collagen fibers, rat tail tendons, hydrothermal contraction, stress-temperature dependence, equilibrium melting, critical parameters and critical tension.