

УДК 591.83+547.962.9+536.628.3

МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН ПРИ ЛАЗЕРНОЙ ОБРАБОТКЕ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

С.В. Аверкиев, Н.Ю. Игнатъева, Э.Н. Соболев, А.Б. Шехтер, С.А. Баранов,
М.В. Обрезкова, В.В. Лунин

(кафедра физической химии)

В работе проведено комплексное исследование хрящевой ткани, подвергшейся ИК-лазерной обработке. Термическая стабильность коллагеновых волокон изучена методом дифференциальной сканирующей калориметрии, определена устойчивость образцов хрящевой ткани к действию трипсина, проведено сравнительное исследование морфологических свойств хрящевой ткани. Показано, что после ИК-лазерной обработки хрящевой ткани в течение 60 с до температуры 70°C происходит лишь частичная (до 16%) денатурация коллагена II. Лазерная обработка приводит к модификации коллагеновых волокон, результатом которой является уменьшение теплового эффекта денатурации коллагена и ослабление его тинкториальных свойств.

ИК-лазерное излучение активно применяют в клинической медицине как новый эффективный метод лечения заболеваний, повреждений и дефектов хрящевой ткани (оториноларингология, ортопедия, пластическая и реконструктивная хирургия) [1–3]. Однако полная картина физико-химических и структурных изменений тканей до сих пор отсутствует. Данная работа посвящена исследованию лазеро-индуцированных превращений коллагена – важнейшего компонента хрящевой ткани.

Коллаген составляет около 25% от общей массы всех белков организма и является основным белком соединительных тканей, определяя морфологию последних [4]. Макромолекула коллагена представляет собой три полипептидные цепи, закрученные в тройную суперспираль. Во внеклеточном матриксе соединительных тканей коллагеновые макромолекулы последовательно укладываются в протофибриллы, фибриллы и, наконец, в коллагеновое волокно.

При термическом нагревании (65–70°C) происходит плавление коллагенового волокна, что на молекулярном уровне описывается переходом: тройная спираль – случайный клубок. Это явление называют денатурацией коллагена. Удельная энтальпия денатурации ΔH_d составляет 65 ± 5 Дж/г коллагена [5–8].

Лазерная обработка соединительных тканей, например фиброзной соединительной ткани (ФСТ), может приводить к значительной усадке и полной денатурации коллагена I, если температура обработки превышает 70°C [9, 10]. Однако при термическом и ИК-лазерном воздействии на интактную хрящевую ткань полной денатурации коллагена II хрящевой ткани не происходит. Различие в тер-

мическом поведении хрящевой ткани и ФСТ обусловлено особенностью строения и составом хрящевой ткани. Ее внеклеточный матрикс можно представить как гель, каркас которого образуют две подсистемы – сеть волокон коллагена II и сеть протеогликанов (ПГ). В хрящевой ткани носовой перегородки содержится около 80% воды, 5–20% коллагена, 2–7% ПГ, а также неколлагеновые белки и липиды [11]. Протеогликановые комплексы хрящевой ткани (агреканы) представляют собой сульфатированные и карбоксилированные полианионы на основе аминсахаров – гликозаминогликаны (ГАГ), присоединенные О-гликозидной связью к стержневому белку (гликопротеину). Агреканы с помощью связующего белка присоединены к длинной цепи гиалуроновой кислоты. Надмолекулярная организация внеклеточного матрикса хрящевой ткани является упорядоченной в том смысле, что места контакта протеогликановой и коллагеновой подсистем находятся в строго определенных местах как для коллагеновых фибрилл, так и для протеогликановой подсистем, как предполагается, имеет неспецифическую (электростатическую) природу и ограничивает мобильность коллагеновых фибрилл за счет сил трения [13]. После удаления протеогликановой компоненты коллаген II полностью денатурирует при температуре 65°C ($\Delta H_d = 60$ Дж/г коллагена) [14]. Таким образом, протеогликановые комплексы в хрящевой ткани выполняют важную функцию термической стабилизации коллагеновых волокон.

В данной работе используются физико-химические и морфологические (гистохимические) методы анализа для исследования изменения свойств колла-

генового волокна в хрящевой ткани при ИК-лазерном воздействии умеренной интенсивности.

Методики

Приготовление образцов хрящевой ткани

Хрящевая ткань носовой перегородки была изъята у 5 особей 12-месячных телят *post mortem*. Образцы хряща использовали в течение 12 ч после иссечения. Из полученных образцов хрящевой ткани нарезали небольшие кусочки размером 0,8×1,5 см и толщиной не более 1–1,2 мм.

ИК-лазерная обработка

Для лазерной обработки образцов тканей использовали излучение эрбиевого волоконного ИК-лазера ЛС-1,56-5 (“ИРЭ-Полюс”, Россия), $\lambda = 1,56$ мкм с выходной мощностью 2 и 3,5 Вт. Излучение лазера с помощью световода подавалось под углом 45° на образцы хрящевой ткани, закрепленные вертикально. Плотность энергии у поверхности облучаемых тканей составляла 6 Вт/см². Поглощенная энергия – около 50 Дж/(г·с). Расстояние между концом световода и облучаемой поверхностью образцов составляло 8 мм, при этом диаметр облучаемой зоны равнялся 6 мм. Образцы тканей облучали в течение 10–50 с. Температуру их поверхности контролировали дистанционно с помощью ИК-камеры “IRTIS 200” со скоростью сканирования 1 кадр/с. Для последующего анализа из хрящевой пластины вырезали облученные зоны.

Определение содержания коллагена

Образцы гидролизуют в течение 1 ч смесью концентрированной соляной и фторуксусной кислот в объемном соотношении 2:1, аминокислотный состав гидролизата определяют с помощью аминокислотного анализатора (“Hitachi-835”, Japan) с предварительным катионообменным разделением и последующей спектрофотометрической реакцией с нингидрином в соответствии со стандартной методикой [15]. Содержание коллагена определяют по количеству коллагенспецифичной аминокислоты – гидроксипролина (Нур), составляющей 13,3% от массы молекулы коллагена [16].

Способ определения степени денатурации коллагена α

В основу определения степени денатурации коллагена легла особенность воздействия трипсина на коллагеновое волокно. Трипсин относится к классу сериновых протеиназ, являющихся катализаторами глубокого гидролиза пептидных связей стержневых и связующих белков протеогликановых агрегатов.

Олигопептиды этих белков и гликозаминогликаны вымываются в раствор при обработке трипсином хрящевой ткани [14]. Отметим, что поврежденные и денатурированные волокна коллагена также подвергаются протеолизу в присутствии трипсина. Нативные макромолекулы и волокна не подвержены действию трипсина [17, 18] по причине топологических ограничений при образовании фермент-субстратного комплекса с жесткой трехспиральной макромолекулой коллагена [19].

Облученные зоны тканей подвергали обработке трипсином в течение 20 ч при 37°C. Масса образца ~50 мг, соотношение (по массе) фермент:субстрат составляло 1:20. Долю денатурированного коллагена α рассчитывали по результатам аминокислотного анализа супернатанта и твердого остатка по формуле (1):

$$\alpha(\%) = m(\text{Нур})_{\text{снт}} / (m(\text{Нур})_{\text{снт}} + m(\text{Нур})_{\text{тво}}), \quad (1)$$

где $m(\text{Нур})_{\text{снт}}$ – количество гидроксипролина в супернатанте, а $m(\text{Нур})_{\text{тво}}$ – количество гидроксипролина в твердом остатке ткани после обработки ферментом.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Термическое поведение образцов хрящевой ткани изучали методом ДСК на дифференциальном сканирующем калориметре (“DSC 822^e”, “Mettler Toledo”, Швейцария).

Образцы массой 5–10 мг герметично закрывали в стандартных алюминиевых чашках (40 мл), образцом сравнения служила аналогичная пустая чашка. Начальная и конечная температуры при калориметрическом исследовании хрящевой ткани составляли 25 и 100°C (в некоторых случаях нагрев начинали от 0°C), а скорость нагрева – 10 К/мин.

Гистологическое исследование

Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (для выявления ядер и цитоплазмы клеток), пикрофуксином по Ван-Гизону (для выявления коллагеновых волокон), толуидиновым синим (для выявления гликозаминогликанов), комбинированной окраской альциановым синим и пикросирусом красным.

Результаты и обсуждение

Деградируемый коллаген в исходных образцах хрящевой ткани

На рис. 1 представлена фотография препарата нативного образца хрящевой ткани, окрашенного пикрофуксином по Ван-Гизону. Равномерная фуксинофилия матрикса свидетельствует о том, что

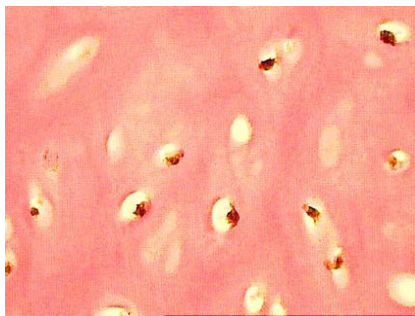


Рис. 1. Нативный образец (без ферментативной обработки и лазерного воздействия) хрящевой ткани носовой перегородки при окраске пикрофуксином по Ван-Гизону (гомогенный фуксинофильный матрикс, клетки сохранены; увеличение 400×)

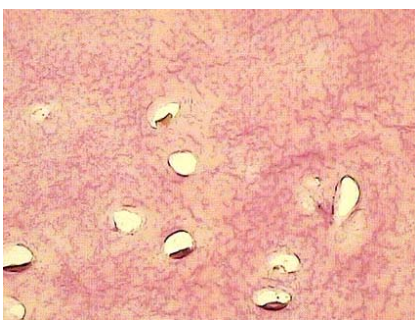


Рис. 2. Образец хряща, обработанного трипсином без лазерного воздействия и окрашенного по Ван-Гизону (клетки повреждены, в матриксе визуализируется сеть тонких коллагеновых волокон; увеличение 400×)

коллагеновые фибриллы не повреждены. Как и во всех типах гиалинового хряща, волокна не визуализируются, так как их выявлению препятствуют протеогликаны. Матрикс выглядит гомогенным.

При окраске по Ван-Гизону препаратов хрящевой ткани, обработанных трипсином, обнаружилось, что интенсивность фуксинофилии такая же, как в интактном хряще. Это свидетельствует об отсутствии изменений в молекулярно-фибриллярной структуре коллагена. Однако фибриллярность коллагенового каркаса выявляется сильнее, чем в интактных хрящах, что связано скорее всего с деструкцией матрикса и демаскированием волокон (рис. 2).

Аминокислотный анализ подтвердил, что в раствор трипсина вымываются олигопептиды стержневых и связующих белков, в то же время коллаген остается в нерастворимом остатке. Нерастворимый в трипсине остаток обогащен гидроксипролином, а супернатант – валином, лейцином и изолейцином, количество которых в стержневом и связующем белках существенно выше, чем в коллагене [16]. Таким образом, трипсин приводит к разрушению

протеогликанов, что и является причиной демаскировки коллагенового волокна. Авторы работы [20] с помощью просвечивающей электронной микроскопии наблюдали увеличение доли “толстых” фибрилл коллагена в образцах хрящевой ткани, подвергнутых обработке разными гликозидазами. Предполагается, что после разрушения декорирующих протеогликанов, определяющих морфологию коллагеновых волокон (их длину и диаметр) [13, 21], происходит латеральная агрегация фибрилл [20, 22]. Поскольку трипсин не разрушает сеть волокон коллагена II и приводит к ее демаскированию, что позволило нам наблюдать отдельные волокна коллагена, то изменения коллагеновых волокон в матриксе хрящевой ткани, подвергшейся ИК-лазерному воздействию, мы исследовали на препаратах, обработанных трипсином.

Величина степени денатурации (α) в нативных образцах хряща, рассчитанная по формуле (1), составила 3–5%. Подобный процент денатурированных молекул коллагена, связанный с деятельностью коллагеназ, обычен для здорового организма [18].

Модификация сети коллагеновых фибрилл ИК-лазерным излучением

Считается, что обработка биоткани ИК-лазерным излучением умеренной интенсивности приводит лишь к ее нагреву [1]. На рис. 3 представлены примеры временных зависимостей температуры поверхности образца хрящевой ткани в ходе ИК-лазерной обработки. Максимальная температура поверхности образца достигала 70–75°C. Именно при такой температуре в клинической практике проводят операции по изменению формы хряща носовой перегородки [3].

Для определения зависимости степени модификации коллагенового волокна от времени лазерного воздействия при достижении максимальной температуры (в дальнейшем называемое временем облучения) его варьировали от 0 до 60 с.

После лазерной обработки в образцах определяли степень денатурации коллагена α . В тех случаях, когда температура поверхности образцов тканей (T_n) при лазерной обработке не превышала 55–60°C, при всех временах облучения (до 1 мин) степень деградации коллагена составляла 2–5%, что соответствует значению α в интактных (необлученных) образцах [18, 23]. При достижении $T_n \sim 70^\circ\text{C}$ и выше α начинает возрастать с увеличением времени лазерной обработки, достигая 15–16%. Таким образом, денатурация коллагена II при лазерном нагреве хрящевой ткани носит по-

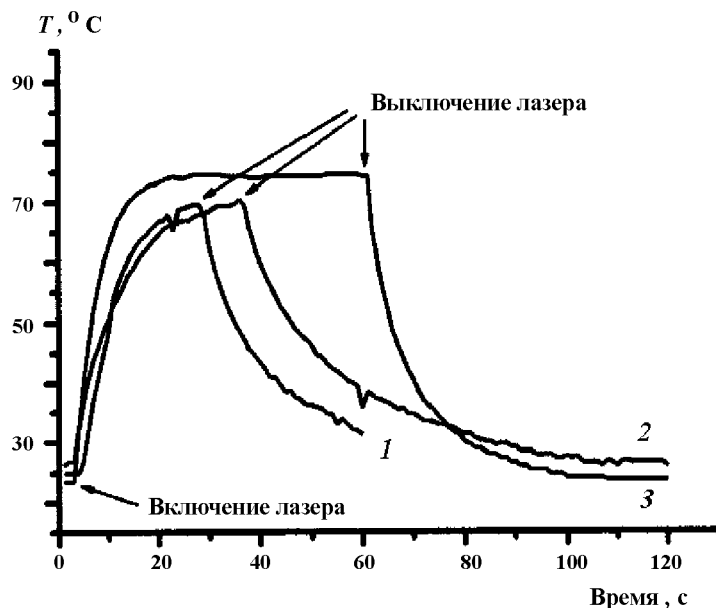


Рис. 3. Температурно-временные профили поверхностей образцов хрящевой ткани при ИК-лазерной обработке (стрелками указаны моменты включения и выключения лазера; номер кривой обозначает номер режима: 1 – нагрев образца до 70°C и немедленное отключение лазера; 2 – нагрев образца до 70°C, выдерживание при этой температуре 5 с и отключение лазера; 3 – нагрев образца до 75°C, выдерживание 30 с при этой температуре и отключение лазера)

роговый (по температуре) характер. Если T_n превышает 70°C, то этот процесс начинается и протекает по мере поглощения ИК-энергии. Однако к полной денатурации коллагена ИК-лазерная обработка не приводит.

Зависимость степени денатурации коллагена (α), рассчитанной по формуле (1), от времени ИК-лазерного облучения при разных значениях максимальной температуры, которые достигаются при лазерном воздействии, приведена на рис. 4.

При гистохимическом исследовании хрящевой ткани, облученной ИК-лазером в режимах 1–3 (рис. 3) и окрашенной затем пикрофуксином, заметно лишь небольшое снижение и неравномерность фуксинофилии коллагена (рис. 5). По всей видимости, снижение фуксинофилии происходит из-за частичной денатурации коллагена II, вызванной лазерным воздействием (α составляет 7–16% (рис. 4)).

После обработки трипсином препарата хрящевой ткани, облученного лазером в тех же режимах, становятся видны детали изменений подсистемы коллагеновых волокон (рис. 6).

При сравнении рис. 2 и 6 отметим, что после ИК-лазерного воздействия (рис. 3, кривая 2) толщина коллагеновых фибрилл увеличивается. Подобное явление наблюдается после ИК-лазерной обработки и других коллагенсодержащих тканей. Например, при гистохимическом исследовании препа-

ратов суставного хряща, подвергнутых неабляционному ИК-лазерному воздействию, была обнаружена фибриллизация (выявление видимых волокон) коллагена II. Слипание фибрилл коллагена I суставной капсулы после ИК-лазерного воздействия умеренной интенсивности наблюдали методом электронной микроскопии [9].

При дальнейшем увеличении времени лазерной обработки (рис. 3, кривая 3) резко снижается фуксинофилия матрикса облученных и подвергнутых

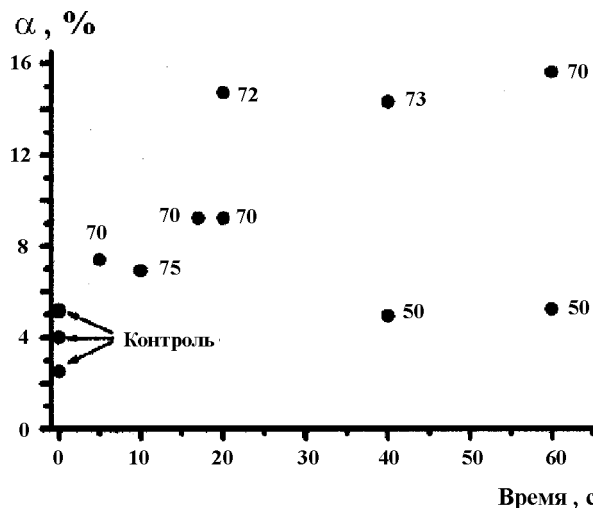


Рис. 4. Зависимость степени денатурации коллагена (α) от времени облучения и от максимального значения температуры

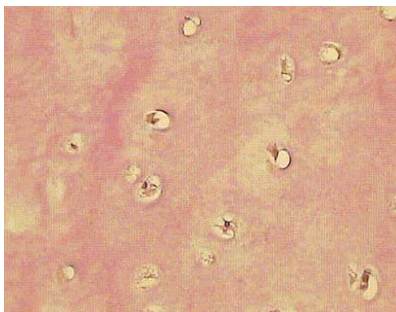


Рис. 5. Образец хряща после ИК-лазерного облучения (рис. 3, кривая 2), окрашенный пикрофуксином по Ван-Гизону (матрикс практически не изменен; увеличение 400×)

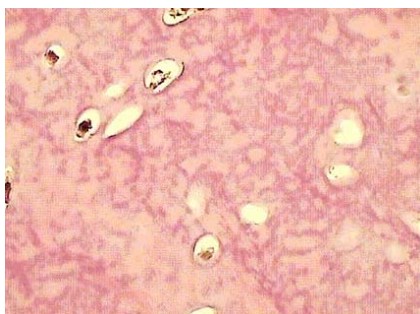


Рис. 6. Образец хряща после ИК-лазерного облучения, обработанный трипсином (рис. 3, кривая 2), окрашенный пикрофуксином по Ван-Гизону (видна фибриллизация и вакуолизация матрикса; увеличение 400×)



Рис. 7. Образец хряща после ИК-лазерного облучения, обработанный трипсином (рис. 3, кривая 3), окрашенный пикросириусом красным (заметно резкое ослабление окраски матрикса; окраска остается только в области лакун и околоклеточном матриксе; увеличение 400×)

затем перевариванию трипсином образцов хрящевой ткани, окрашенных по Ван-Гизону или пикросириусом красным (рис. 7). Фибриллярные структуры в матриксе, которые были отнесены к увеличившимся в диаметре коллагеновым фибриллам, на рис. 7 не видны. Однако образец не растворяется полностью в трипсине и рассчитанное значение \dot{a} не превышает 16% (рис. 4).

Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии облученного и подвергнутого ферментативной обработке препарата хрящевой ткани (рис. 3, кривая 3), а также аналогичного препарата, не подвергнутого лазерному воздействию, представлены на рис. 8. Тепловой эффект денатурации коллагена II в облученном и обработанном трипсином препарате составил 31 ± 2 Дж/г коллагена (рис. 8, кривая 1), что заметно меньше теплового эффекта денатурации коллагена II в необлученном препарате хрящевой ткани, (53 ± 2 Дж/г коллагена) (рис. 8, кривая 2), практически соответствующего энтальпии плавления коллагена II. Можно предположить, что коллагеновые фибриллы под действием ИК-лазерного излучения претерпевают такое изменение, что, с одной стороны, они уже не содержат нативных трехспиральных молекул, энтальпия денатурации которых составляет 60 ± 5 Дж/г, а с другой стороны, эти молекулы еще не находятся в конформации случайных клубков, что защищает их от переваривания трипсином.

Таким образом, данные ДСК указывают на модификацию волокон коллагена II в хрящевой ткани при ИК-лазерном воздействии умеренной интенсивности, что коррелирует с их видимыми морфологическими изменениями и частичной потерей тинкториальных свойств после обработки трипсином (рис. 6, 7).

ИК-лазерное воздействие на хрящевую ткань приводит к постепенной дезорганизации достаточно жесткого каркаса, образованного неспецифически взаимодействующими подсистемами коллагеновых

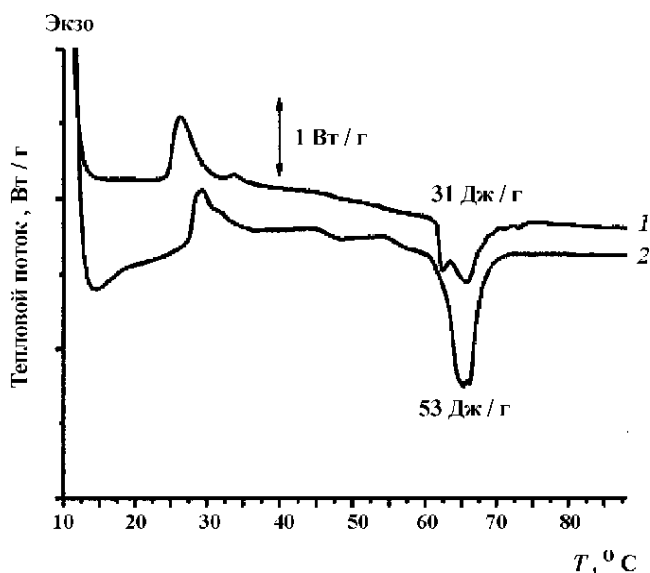


Рис. 8. Термограммы облученного (1) и необлученного (2) препаратов хрящевой ткани, подвергнутых ферментативной обработке трипсином

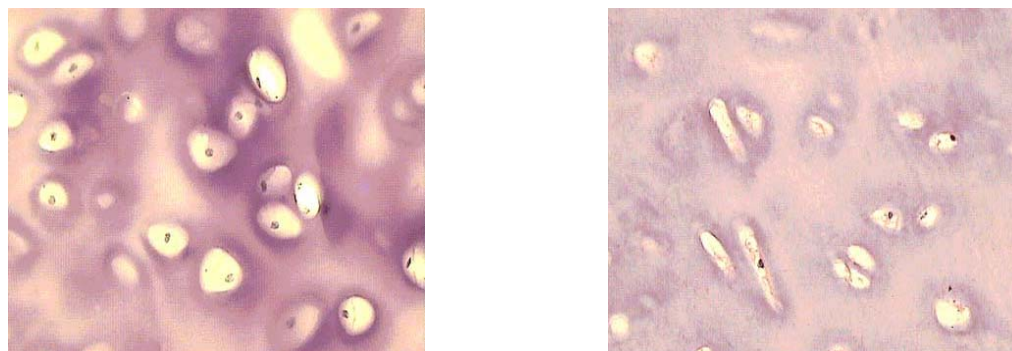


Рис. 9. Контрольный (слева) и облученный (справа) образцы хряща, окрашенные толуидиновым синим (в облученном образце содержание гликоаминогликанов понижено; увеличение 400×)

волокон и протеогликанов. Именно за счет их взаимодействия коллаген II в интактной хрящевой ткани не денатурирует [14]. Принимая во внимание пороговый характер изменения степени денатурации коллагена II (рис. 4), мы полагаем, что при лазерном нагреве ткани до температур, равных или несколько превышающих 70°C, происходит дезорганизация подсистем коллагеновых волокон и протеогликанов. Подтверждением этого является частичное разрушение протеогликанов в облученных образцах хряща, окрашенных толуидиновым синим (рис. 9).

Однако дезорганизация упомянутых выше подсистем не подразумевает их полного разобщения, поскольку коллаген II в хрящевой ткани все еще не способен к полной денатурации до тех пор, пока не будут удалены трипсином протеогликаны и гликозаминогликаны. После произошедшей дезорганизации матрикса хрящевой ткани, коллагеновые фибриллы начинают “слипаться”, увеличиваясь в диаметре. При этом под действием лазерного излучения структура коллагеновых фибрилл меняется таким образом, что тепловой эффект их денатурации уменьшается почти в два раза.

В месте фокуса лазерного луча (рис. 10) наблюдается практически полная деструкция хрящевой ткани с полным отсутствием в ней нативного коллагена. Такие глобальные деструктивные изменения в облученной зоне хрящевой ткани наблюдались нами практически во всех случаях, когда время лазерной обработки составляло >2 мин, а значение T_n превышало 85°C. При этом облученные образцы практически полностью растворяются под действием трипсина. Это говорит о полном разобщении систе-

мы коллагеновое волокно–протеогликан, способствующем протеканию полной денатурации коллагена и его последующему протеолитическому расщеплению трипсином. Однако в данной работе подобные (близкие к абляционным) режимы лазерного воздействия мы не рассматриваем по причине их неприменимости в реальной медицинской практике хондропластики.

Таким образом, показано, что ИК-лазерное воздействие умеренной интенсивности ($T_n < 85^\circ\text{C}$) даже в течение 60 с не приводит к полной денатурации коллагена II. Однако при значениях температуры ~70°C начинаются дезорганизация системы коллагеновое волокно–протеогликан и увеличение диаметра фибрилл коллагена II. ИК-излучение модифицирует коллагеновые волокна так, что тепловой эффект их денатурации уменьшается в два раза. ИК-лазерный нагрев до температур >85°C приводит к полной деструкции межклеточного матрикса.



Рис. 10. Образец хряща, облученный ИК-лазером (рис. 3, кривая 3, зона фокуса лазерного луча), обработанный трипсином и окрашенный по Ван-Гизону, хорошо видна деструкция матрикса; увеличение 400×

Авторы благодарят РФФИ (гранты 02-04-16743, 05-02-16902а) и CRDF (грант RP2-5003-МО-03) за поддержку данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Roggan A.* // Laser Induced Interstitial ThermoTherapy. Bellingham, Washington, 1995.
2. *Sobol E., Bagratashvili V., Vorobieva N., Zakharkina O., Omelchenko A., Baskov A., Shekhter A., Zhelvakov S., Bortschenko I.* / Proc. World Spine II: The Second Interdisciplinary Congress on Spine Care. August 10-13. USA. Chicago, 2003. P. 173.
3. *Sobol E., Sviridov A., Omelchenko A., Bagratashvili V.* // Biotech. Genetic Eng. Rev. 2000. **17**. P. 553.
4. *Ottani V., Raspanti M., Ruggeri A.* // Micron. 2001. **32**. P. 251.
5. *Церетели Г.И.* // Биофизика. 1982. **27**. С. 780.
6. *Luescher M., Ruegg M., Shindler P.* // Biopolymers. 1974. **13**. P. 2489.
7. *Kopp J., Bonnet M., Renou J.P.* // Matrix. 1989. **9**. P. 443.
8. *Miles C.A., Ghelashvili M.* // Biophys. J. 1999. **76**. P. 3243.
9. *Hayashi K., Thabit G. III, Vailas A.C., Bogdanske J.J., Cooley A.J., Markel M.D.* // Am. J. Sports Med. 1996. **24**. P. 640.
10. *Ignatyeva N.Yu., Sobol E.N., Lunin V.V., Averkiev S.V., Bagratashvili V.N., Svitridov A.P., Korobov M.V.* // Laser Physics. 2003. **13**. P. 1.
11. *Rotter N., Tobias G., Lebl M., Roy A.K., Hansen M.C., Vacanti Ch. A., Bonassar L. J.* // Arch. Biochem. Biophys. 2002. **403**. P. 132.
12. *Scott J.E.* // Biochem. J. 1988. **252**. P. 313.
13. *Schmidt M.B., Mow V.C., Chun L.E., Eyre D.R.* // J. Orthop. Res. 1990. **8**. P. 353.
14. *Игнатъева Н.Ю., Соболев Э.Н., Аверкиев С.В., Лунин В.В., Гроховская Т.Е., Баграташвили В.Н., Янцен Е.С.* // ДАН. 2004. **395**. С. 696.
15. *Tsugita A., Scheffler J.-J.* // Eur. J. Biochem. 1982. **124**. P. 585.
16. *Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A.* // Nucleic Acids Res. 2003. **31**. P. 3784.
17. *Bruckner P., Prockop D.J.* // Anal. Biochem. 1981. **110**. P. 360.
18. *Hollander A.P., Heathfield T.F., Webber C., Iwata Yu., Bourne R., Rorabeck C., Poole A.R.* // J. Clin. Invest. 1994. **93**. P. 1722.
19. *Степанов В.М.* Молекулярная биология. М., 1996.
20. *Quacci D., Dell'Orbo C., Diaz G.* // Ann. Anat. 1992. **174**. P. 569.
21. *Hagg R., Bruckner P., Hedbom E.* // J. Cell Biol. 1998. **142**. P. 285.
22. *Kuhn K., von der Mark K.* // Suppl. Thromb. Haemost. 1978. **63**. P. 123.
23. *Bank R.A., Krikken M., Beekman B., Stoop R., Maroudas A., Lafeber F., TeKoppele J.M.* // Matrix Biol. 1997. **16**. P. 233.
24. *Шехтер А.Б., Соболев Э.Н.* // Лазерная медицина. 2001. **5**. № 4. С. 27

Поступила в редакцию 19.09.05

COLLAGEN FIBRE MODIFICATION UNDER LASER TREATMENT OF THE CARTILAGE

S.V. Averkiev, N.Yu. Ignat'yeva, Ye.N. Sobol', A.B. Shekhter, S.A. Baranov, M.V. Obrezkova, V.V. Lunin

(Division of Physical Chemistry)

An integrated study of the cartilage treated by IR laser radiation was carried out in this work. Thermal stability of the collagen fibres was studied by Differential Scanning Calorimetry, steadiness of the cartilage samples to the trypsin digestion was defined and comparison investigation of the cartilage' morphological properties was done. It was shown that after 60 sec of the laser irradiation of the cartilage at 70°C only partial denaturation (до 16%) of the collagen type II took place. Laser treatment results in a collagen fibres modification leading to the decrease of the enthalpy of the collagen denaturation and to the weakening of his tinctorial properties.