

# ДИНАМИКА СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА НА РАННИХ СРОКАХ РАЗВИТИЯ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

УДК 576.31:616-018.2  
Поступила 30.09.2011 г.



**М.В. Кочуева**, врач-радиолог<sup>1</sup>;  
**Н.Ю. Игнатъева**, к.х.н., доцент химического факультета<sup>2</sup>;  
**О.Л. Захаркина**, научный сотрудник<sup>3</sup>;  
**В.А. Каменский**, к.ф.-м.н., доцент, ведущий научный сотрудник<sup>4</sup>;  
**Л.Б. Снопина**, д.б.н., доцент, зав. отделом морфологии ЦНИЛ<sup>5</sup>;  
**К.С. Кулабухова**, студентка биологического факультета<sup>6</sup>;  
**А.В. Масленникова**, д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики и лучевой терапии<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский областной онкологический диспансер, Н. Новгород, 603126, ул. Родионова, 190, корп. 5;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, ГСП-1, Ленинские горы;

<sup>3</sup>Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, г. Шатура, Московская область, 140700, ул. Святоозерская, 1;

<sup>4</sup>Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603155, ул. Ульянова, 46;

<sup>5</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

<sup>6</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

**Цель исследования** — комплексное изучение механизмов развития радиационно-индуцированного повреждения коллагена и последующего восстановления его структуры на различных уровнях иерархической организации.

**Материалы и методы.** В качестве модели коллагенсодержащей ткани использованы сухожилия хвостов крыс. Облучение в дозах 2, 4, 6, 8 и 10 Гр проводилось на гамма-аппарате «Луч-1» (Россия) *in vivo*. Структура коллагена через 1 и 7 сут после облучения изучалась методами определения устойчивости к воздействию трипсина, дифференциальной сканирующей калориметрии, конфокальной микроскопии с имиджингом генерации второй гармоники, кросс-поляризационной оптической когерентной томографии.

**Результаты.** Установлены определенные закономерности динамики изменений структуры коллагена в зависимости от срока после облучения. Через сутки после облучения коллагенсодержащей ткани ведущими являются процессы нарушения структуры коллагена на молекулярном уровне в результате воздействия активных форм кислорода. В течение недели после облучения происходит частичное восстановление структуры коллагена и, соответственно, его устойчивости к протеолитическому воздействию. Ионизирующее излучение инициирует каскад реакций, начинающихся с непосредственного и опосредованного повреждения белка и завершающихся его ремоделированием в результате образования неферментативных сшивок между тройными спиральями, формирующими четвертичную структуру коллагена.

**Ключевые слова:** структура коллагена; ионизирующее излучение; радиационно-индуцированное повреждение; ремоделирование коллагена.

## English

## Collagen Structural Changes in Early Radiation-Induced Damage

**M.V. Kochueva**, Radiologist<sup>1</sup>;  
**N.Y. Ignatieva**, PhD, Associate Professor, the Faculty of Chemistry<sup>2</sup>;  
**O.L. Zakharkina**, Research Worker<sup>3</sup>;  
**V.A. Kamensky**, PhD, Associate Professor, Leading Research Worker<sup>4</sup>;  
**L.B. Snopova**, D.Bio.Sc., Associate Professor, Head of the Morphology Department, Central Scientific Research Laboratory<sup>5</sup>;  
**K.S. Kulabukhova**, Student of the Biological Faculty<sup>6</sup>;  
**A.V. Maslennikova**, D.Med.Sc., Professor, the Department of Radiodiagnosis and Radiotherapy<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod Regional Oncological Hospital, Rodionova St., 190, Block 5, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603126;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, GSP-1, Leninskie Gory, Moscow, Russian Federation, 119991;

Для контактов: Масленникова Анна Владимировна, тел. моб. +7 920-251-70-33; e-mail: maslennikova.anna@gmail.com

<sup>3</sup>Institute on Laser and Information Technologies of the Russian Academy of Sciences, Svyatoozerskaya St., 1, Shatura, Moscow Region, Russian Federation, 140700;

<sup>4</sup>Institute of Applied Physics of Russian Academy of Sciences, Ul'yanova St., 46, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603155;

<sup>5</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

<sup>6</sup>Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

**The aim of the investigation** is complex study of the mechanisms of radiation-induced collagen damage and following recovery of its structure on various levels of multilayer organization.

**Materials and Methods.** Rat tail tendons were used as the model of collagen containing tissue. The animals were exposed to radiation at the dosage of 2, 4, 6, 8, and 10 Gy using gamma-apparatus "Luch-1" (Russia) *in vivo*. The collagen structure was studied 1 and 7 days after the radiation by trypsin-resistance test, differential scanning calorimetry, confocal microscopy with second-harmonic generation imaging, and cross polarization optical coherence tomography.

**Results.** There were determined certain regularities of collagen structural changes depending on radiation time. One day after the radiation of collagen containing tissue the leading processes were those of collagen structural damage at molecular level due to reactive oxygen species exposure. Within a week after the radiation, the collagen structure recovered partially, and therefore, there recovered its resistance to proteolytic activity. Ionizing radiation initiated the cascade of reactions beginning with direct and indirect protein damage, and resulting in its remodeling as a result of nonenzymic bridging between triple helix forming quaternary structure of collagen.

**Key words:** collagen structure; ionizing radiation; radiation-induced damage; collagen remodeling.

Проблема радиационно-индуцированных изменений нормальных тканей до сих пор сохраняет свою актуальность [1]. Степень лучевых повреждений, возникающих в ранние и поздние сроки после проведения облучения, может варьировать от клинически незначимых изменений до тяжелых осложнений, существенно влияющих на качество жизни пациентов [2]. Для разработки эффективных методов профилактики, диагностики и лечения побочных эффектов лучевой терапии необходимо подробное изучение механизмов развития повреждения и последующей регенерации биологических тканей.

В динамике изменений тканей, индуцированных воздействием ионизирующего излучения, важную роль отводят прогрессирующим нарушениям микроциркуляции, а также деструкции коллагена, которая вызывает рубцовые изменения и опосредованную облитерацию сосудистого русла [3–5]. В качестве основных механизмов радиационно-индуцированных нарушений структурного и функционального состояния коллагена до настоящего времени рассматривались фрагментация молекул и деградация его структуры вследствие прямого разрыва пептидных цепей, а также образование поперечных сшивок при опосредованном воздействии активных форм кислорода [6–9]. В течение последних 5 лет проведены исследования, позволившие с помощью современных методов получить подробную информацию о механизмах развития радиационно-индуцированного повреждения коллагена [10–13]. Данные работы, однако, осуществляли с целью изучения процессов перестройки коллагена, возникающих в ходе стерилизации аллотрансплантатов кожи (аллодерм) ионизирующим излучением. Эксперименты проводили *in vitro* с использованием доз излучения (2–30 кГр), на порядки превышающих дозы, применяемые в целях лучевой терапии. Динамика повреждения и последующего восстановления структуры коллагена *in vivo* при облучении в дозах, используемых в процессе лучевой терапии по поводу злокачественных новообразований, до настоящего времени не изучена.

**Цель исследования** — изучение дозовременных зависимостей динамики состояния коллагена на различных уровнях его иерархической организации под воздействием ионизирующего излучения на ранних сроках развития радиационно-индуцированного повреждения.

**Материалы и методы.** В качестве модели коллагенсодержащей среды выбрано сухожилие хвостов крыс. Эта ткань, благодаря квазикристаллической одноосной укладке молекул в фибриллы, фибрилл в волокна, а волокон в пучки, является идеальной модельной системой, изменения которой можно трактовать однозначно. Эксперименты выполняли на белых беспородных крысах (всего 28 животных), содержащихся в стандартных условиях вивария. Исследования проводили в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006). Облучение осуществляли *in vivo* под общей анестезией (Золетил, 50 мг/кг массы) на аппарате для дистанционной лучевой терапии «Луч-1» (Россия) (энергия пучка — 1,25 МэВ) однократно в дозах 2, 4, 6, 8 и 10 Гр. Структуру коллагена изучали с использованием комплекса методов в сроки 1 и 7 сут после облучения.

Определение устойчивости к воздействию трипсина является классическим методом выявления степени деградации молекул коллагена, поскольку данный протеолитический фермент индуцирует деполимеризацию исключительно поврежденных молекул, тогда как трехспиральные интактные молекулы оказываются устойчивыми к его воздействию [14]. Образцы препарированного сухожилия высушивали на воздухе в течение 24 ч при 37°C, после чего в течение суток выдерживали в растворе трипсина (концентрация — 1 мг/мл, отношение фермент : субстрат — 1:10) с добавлением азида натрия (0,02%). Количественной характеристикой ус-

тойчивости к трипсину является убыль массы образца после инкубации.

Способность образца коллагенового матрикса сорбировать воду зависит не только от его состава, но и от взаимодействия биополимеров матрикса, определяющего количество доступных для адсорбции воды полярных групп и других характеристик его молекулярной и надмолекулярной организации. Изменение равновесного содержания воды является, таким образом, интегральной характеристикой изменений, влияющих в том числе и на механические свойства соединительной ткани. Содержание воды в образцах определяли гравиметрически после набухания высушенных препаратов в 0,15 М растворе NaCl в течение 6 ч при 37°C. Содержание воды представляли как массу воды на 1 г высушенного препарата ткани.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является прямым и наиболее эффективным методом регистрации на термограммах тепловой денатурации белка и позволяет определить долю интактных макромолекул (по теплоте перехода спираль–клубок– $\Delta H$ ) и совершенство фибриллярной упаковки (по температуре денатурации —  $T_d$ ); кроме того, динамика  $T_d$  отражает изменения степени кросс-поперечного сшивания коллагенового волокна [15]. Образцы сухожилия для ДСК хранили при -20°C, непосредственно перед анализом изымали и выдерживали в 0,15 М растворе NaCl в течение 1 ч при комнатной температуре. Исследования проводили на дифференциальном сканирующем калориметре Mettler TA 4000. Образцы массой 7–10 мг помещали в герметичный алюминиевый бокс и нагревали в ячейке DSC30 от 5 до 100°C со скоростью сканирования 10°/мин. Определяемый тепловой эффект денатурации коллагена  $\Delta H$  пересчитывали на сухую массу образцов.

Для описания структуры коллагена на уровне волокон и пучков использована многофотонная микроскопия с генерацией второй гармоники (ГВГ).

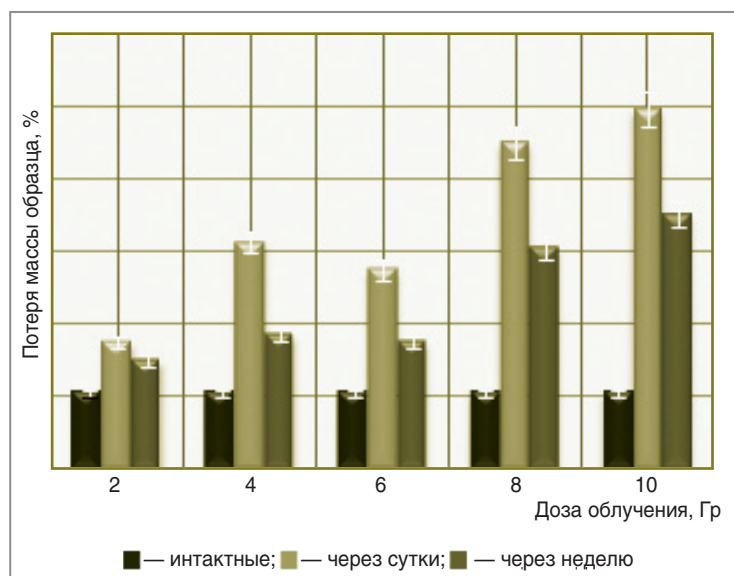


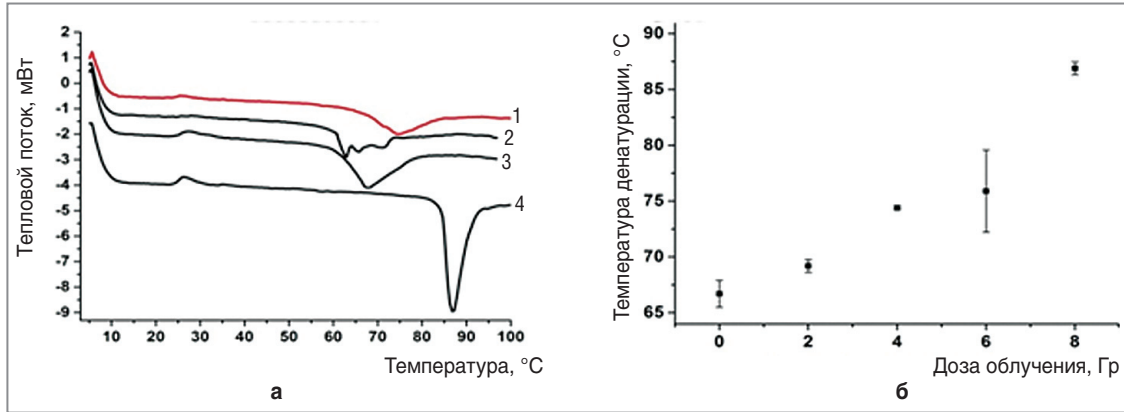
Рис. 1. Потеря массы образцов сухожилия в растворе трипсина в зависимости от дозы и срока после облучения

Исследования проводили на микроскопе LSM Meta (Karl Zeiss, Германия). Возбуждение осуществляли импульсным (100 фс) излучением Ti:сапфир-лазера (MaiTai HP, Spectra Physics, США) на длине волны 800 нм с частотой повторения импульсов 80 МГц. Каждая линия изображения усреднялась по 8 сканам для улучшения отношения сигнал–шум. Образцы фиксировали в 4% растворе формальдегида; непосредственно перед съемкой пучки коллагена диаметром ~400 мкм выделяли из препаратов ткани и помещали между покровными стеклами с целью предотвращения высыхания.

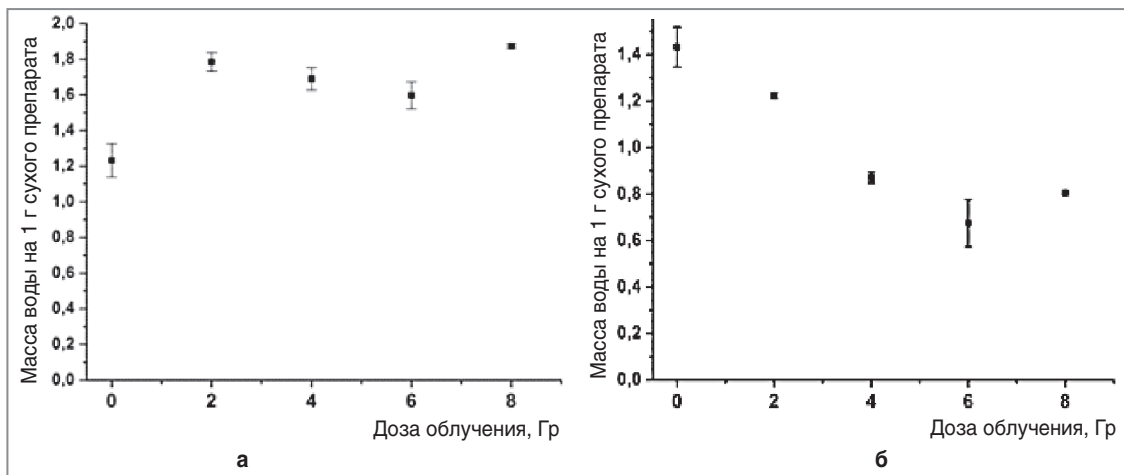
Для мониторинга изменений на уровне общей архитектоники сухожилия использовали кросс-поляризационную оптическую когерентную томографию (КП ОКТ) [16]. Данный метод позволяет в режиме реального времени получать оптические изображения объекта в прямой и ортогональной поляризации одновременно с разрешением 10–15 мкм на глубине 1–2 мм. Наличие анизотропных свойств ткани приводит к появлению интерференционной картины в приемном сигнале, что на томограммах проявляется в виде регулярного чередования темных и светлых полос с периодом  $z_0$ . Исследование методом КП ОКТ проводили *in vivo* по всей длине препарированного сухожилия в условиях общей анестезии.

**Результаты.** Выявлена определенная последовательность изменений структуры коллагена в зависимости от срока после облучения. Потеря массы интактных образцов сухожилий в растворе трипсина составляет не более 2%, что связано с протеолизом неколлагеновых белков матрикса ткани. Через 24 ч после облучения наблюдалось увеличение потери массы сухожилия по сравнению с интактными образцами на 5–10%, при этом различия между потерей массы интактных и облученных образцов оказались статистически значимыми независимо от дозы облучения. Потеря массы образца линейно возрастала с увеличением дозы облучения. Через неделю после облучения выявлялось уменьшение потери массы образца, которое, однако, не достигало исходного уровня (рис. 1).

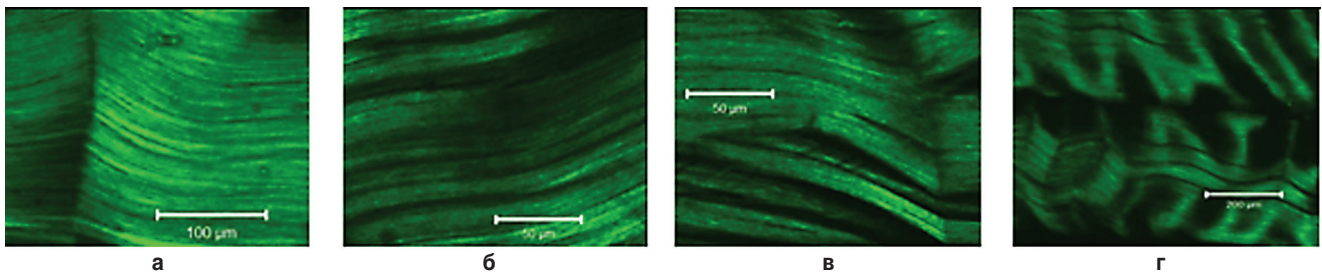
На термограммах ДСК образцов сухожилий (рис. 2) при нагревании ткани наблюдаются два процесса. Первый протекает при 25°C, является экзотермическим и связан с образованием водородных связей между полярными группами коллагена и молекулами воды [15]. Второй процесс — эндотермический, отражает поглощение теплоты при переходе макромолекул коллагена из спирали в клубок, т.е. процесс денатурации [15, 17–19]. Для интактных образцов теплота экзотермического перехода составляла  $\Delta H = -(5 \pm 1)$  Дж/г, а денатурация осуществлялась при  $66,7 \pm 1,2^\circ\text{C}$  и характеризовалась теплотой  $\Delta H_d = 42,1 \pm 0,5$  Дж/г сухого препарата ткани. Эта величина соответствует теплоте денатурации коллагена в тканях сухожилий и связок [18, 19]. Ионизирующее воздействие оказало значительное влияние на вид и характеристики эндотермы денатурации, которая через сутки после облучения была представлена несколькими пиками



**Рис. 2.** Типичные ДСК-термограммы образцов сухожилий (а): 3 — интактный; 2 — 2 Гр, 24 ч; 1 — 4 Гр, неделя; 4 — 8 Гр, неделя и зависимость температуры денатурации коллагена в ткани сухожилий от дозы облучения через неделю после ионизирующего воздействия (б)



**Рис. 3.** Изменение уровня гидратации сухих препаратов облученных сухожилий хвостов крыс через 24 ч (а) и неделю (б) после воздействия



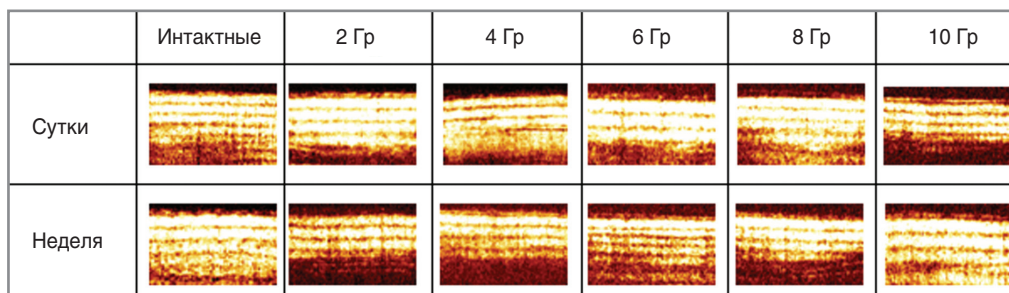
**Рис. 4.** ГВГ-изображения сухожилий хвостов крыс: а — интактный образец; б — через 24 ч после облучения, 4 Гр; в — через 24 ч после облучения, 6 Гр; г — через неделю после облучения, 6 Гр

с максимумами  $63,7 \pm 1,2^\circ\text{C}$ ,  $67,0 \pm 1,5^\circ\text{C}$  и  $71,0 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , а значение  $\Delta H$  снижалось до  $31,1 \pm 3,5$  Дж/г. Через неделю после лучевого воздействия температура денатурации увеличивалась, причем ее рост находился в положительной корреляции с дозой воздействия (рис. 2, б), а пики с максимумами ниже, чем  $T_d$  коллагена в интактной ткани, исчезали (рис. 2, а, кривая 4).

Через 24 ч после облучения сорбционная способность высушенных образцов сухожилий существенно возрастала, что свидетельствовало о разрушении молекулярной структуры и подтверждало результаты ис-

следования устойчивости к трипсину (рис. 3, а). Через неделю после облучения способность сухожилия сорбировать воду снижалась пропорционально дозе облучения (рис. 3, б).

При изучении строения сухожилия с использованием многофотонной микроскопии на ГВГ-изображениях интактных образцов волокна были плотно уложены в параллельные первичные и вторичные пучки (рис. 4, а), на которых периодически встречались характерные для сухожильной ткани остроугольные складчатости (кримпы) [20]. На ГВГ-изображениях облученных об-



**Рис. 5.** Изображения кросс-поляризационной оптической когерентной томографии сухожилия в зависимости от дозы облучения и сроков после облучения

разцов через сутки после воздействия структура волокон сохранялась, однако наблюдалось значительное расслоение вторичных пучков, особенно характерное для области складчатостей (рис. 4, б, в). Через неделю после облучения отмечалось значительное увеличение числа таких складчатостей по сравнению с интактными образцами (рис. 4, г).

Упорядоченная упаковка стержнеобразных макромолекул коллагена в сухожилии обуславливает анизотропию ткани, включая двулучепреломление [21]. Различие в показателях преломления для ортогональных поляризаций дает чередование темных и светлых полос на КП ОКТ-изображениях (рис. 5) с периодом осцилляции интерференционного сигнала 90 мкм. Анализ КП ОКТ-изображений образцов сухожилий, подвергнутых ионизирующему излучению в дозах от 2 до 10 Гр, показал, что период осцилляции остается неизменным при данных сроках после облучения и серьезные нарушения упорядоченной анизотропной укладки коллагена отсутствуют.

**Обсуждение результатов.** Факт нарушений структуры коллагена после воздействия ионизирующего излучения известен с середины XX в. и достаточно широко освещен в литературе [7–9]. Авторами впервые представлена динамика дегенеративных и регенеративных процессов основного белка соединительной ткани *in vivo* на всех уровнях его иерархической организации в зависимости от дозы и срока после облучения. Установлено, что изменения коллагена развиваются в основном на молекулярном уровне, а также на уровне волокон и происходят в несколько этапов. На первом этапе отмечается частичное разрушение связей на уровне трехспиральной структуры, что отражается в снижении устойчивости образцов к протеолитическому воздействию, температуры денатурации и увеличении сорбционной емкости по сравнению с интактными образцами. Наличие на ДСК-термограммах низкотемпературного пика (или плеча) через сутки после облучения указывает на появление в образцах менее стабильной фракции коллагена (см. рис. 2). Таким образом, через 24 ч после облучения наблюдается частичная дезорганизация матрикса, заключающаяся в деградации отдельных макромолекул коллагена и нарушении их взаимодействия с другими химическими составляющими матрикса.

Через неделю после облучения наблюдается перестройка структуры коллагена с увеличением количест-

ва кросс-поперечных сшивок, что подтверждается повышением температуры денатурации и снижением сорбционной емкости образцов по сравнению с контролем. Эти сшивки могут образовываться за счет конденсации аминогрупп боковых цепей остатков лизина и аль-лизина, который в свою очередь образуется в результате окислительного дезаминирования  $\text{NH}_2$ -группы активными формами кислорода, генерация которых наблюдается при воздействии гамма-излучения. Возможно, значительную роль в развитии радиационно-индуцированного повреждения играет и малоновый альдегид, уровень которого в организме значительно возрастает под воздействием ионизирующего излучения [11]. Через неделю после облучения значение  $\Delta H$  перехода спираль–клубок и экзотермический тепловой эффект образования водородных связей водно-мостиковых структур возвращаются к уровню интактного сухожилия. Это означает, что макромолекулы коллагена в этих образцах находятся в конформации тройной спирали. Существенное увеличение  $T_d$  основной фракции коллагена указывает на затруднения образования аморфной фазы из квазикристаллической [22]. Эти затруднения связаны с избытком межмолекулярных кросс-поперечных сшивок, ограничивающих подвижность полипептидных цепей и препятствующих переходу тройной спирали в случайный клубок [22, 17].

Нельзя исключить, что расслоение третичных пучков, наблюдаемое на ГВГ-изображениях сухожилий, связано с повреждением фибробластов, расположенных между вторичными и третичными пучками [22]. Наблюдаемое увеличение складчатости (кримпов) в облученных образцах коррелирует с известным фактом уменьшения модуля Юнга соединительных тканей, подвергнутых гамма-облучению. Кроме того, увеличение числа кримпов является показателем уменьшения в ткани натяжения (в том числе и внутреннего стресса), а их наличие гарантирует растяжение ткани при низких уровнях напряжения [20].

При изменении архитектоники ткани происходит изменение степени ее анизотропии и показателя преломления. При этом меняются период осцилляции интерференционного сигнала и, соответственно, ширина полос на КП ОКТ-томограммах. Поэтому КП ОКТ является крайне чувствительным методом диагностики при деградации коллагенового матрикса, особенно в тканях с плотной и организованной упаковкой, какими являют-

ся сухожилия. Отсутствие качественных и количественных изменений на КР ОКТ-томограммах облученных сухожилий однозначно указывает, что архитектура соединительной ткани при суммарных дозах от 2 до 10 Гр в целом сохраняется. Наши результаты находятся в согласии с данными работы [13], в которой с помощью просвечивающей электронной микроскопии показано отсутствие изменений коллагеновых фибрилл и их укладки в ткани кожи крыс, подвергнутых ионизирующему излучению в дозе 10 Гр.

**Заключение.** Через сутки после облучения коллагенсодержащей ткани ведущими являются процессы нарушения структуры коллагена на молекулярном уровне в результате воздействия активных форм кислорода. В течение недели после облучения происходит частичное восстановление структуры коллагена и, соответственно, восстановление его устойчивости к протеолитическому воздействию. Ионизирующее излучение инициирует каскад реакций, начинающихся с непосредственного и опосредованного повреждения белка и завершающихся его ремоделированием в результате образования неферментативных сшивок между тройными спиралями, которые формируют четвертичную структуру коллагена.

#### Литература/References

1. Coppes R. Evaluation of normal tissue response to particle irradiation from preclinical studies: radiobiological effectiveness and dose distribution. Prediction, recognition, evaluation and eradication of normal tissue effects (PREVENT). Abstracts. 2011; 20–21 March; Brussels, Belgium. *Radiother Oncol* 2011; 98: S10. DOI:10.1016/S0167-8140(11)71729.
2. *Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.03, DCTC, NCI, NIH, DNNS.* June 14, 2010. <http://ctep.cancer.gov>.
3. Antonakopoulos G.N., Hicks R.M., Berry R.J. The subcellular basis of damage to the human urinary bladder induced by irradiation. *J Pathol* 1984; 143(2): 103–116.
4. O'Sullivan B., Levin W. Late radiation-related fibrosis: pathogenesis, manifestations, and current management. *Seminars in Radiation Oncology* 2003; 13(3): 274–289.
5. Bidhu K. Mohanti, Bansal M. Late sequelae of radiotherapy in adults. *Supportive Care in Cancer* 2005; 13(10): 775–780.
6. Braams R. The effect of electron radiation on the tensile strength of tendon. *Int Jour Appl Radiat Biol* 1961; 4: 27–31.
7. Bowes J.H., Moss J.A. The effect of gamma radiation on collagen. *Radiat Res* 1962; 16: 211–223.
8. Bailey A.J., Bendall J.R., Rhodes D.N. The effect of irradiation on the shrinkage temperature of collagen. *Int J Appl Radiat Isotopes* 1962; 13: 131–136.
9. Bailey A.J. Irradiation-induced changes in the denaturation temperature and intermolecular crosslinking of tropocollagen. *Radiat Res* 1967; 31(2): 206–214.
10. Gouk S.-S., Lim T.-M., Teoh S.-H., Sun W.Q. Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2008; 84B: 205–217.
11. Sun W.Q., Leung P. Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation. *Acta Biomaterialia* 2008; 4: 817–826.
12. Shah N.B., Wolkers W.F., Morrissey M., et al. Fourier transform infrared spectroscopy investigation of native tissue matrix modifications using a gamma irradiation process. *Tissue engineering* 2009; A(15): 1–8.
13. Balli E., Comelekoglu U., Yalin E., et al. Exposure to gamma rays induces early alterations in skin in rodents: mechanical, biochemical and structural responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72: 889–894.
14. Bruckner P., Prockop D.J. Proteolytic enzymes as probes for the triple-helical conformation of procollagen. *Anal Biochem* 1981; 110(2): 360–368.
15. Miles Ch.A., Ghelashvili M. Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. *Biophysical Journal* 1999; 76: 3243–3252.
16. Kuranov R.V., Sapozhnikova V.V., Turchin I.V., Zagaynova E.V., Gelikonov V.M., Kamensky V.A., Snopova L.B., Prodanetz N.N. Complementary use of cross-polarization and standard OCT for differential diagnosis of pathological tissues. *Opt Express* 2002; 10: 707–713.
17. Ignatieva N.Yu., Zakharkina O.L., Andreeva I.V., et al. Effects of laser irradiation on collagen organization in chemically induced degenerative annulus fibrosus of lumbar intervertebral disc. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 422–432.
18. Bigi A., Cojazzi G., Roveri N., Koch M.H.J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation. *J Biol Macromol* 1987 December; 9: 363–367.
19. Willett T.L., Labow R.S., Lee J.M. Mechanical overload decreases the thermal stability of collagen in an in vitro tensile overload tendon model. *J Orthop Res* 2008; 26(12): 1605–1610.
20. Franchi M., Fini M., Quaranta M., et al. Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon. *J Anat* 2007 Jan; 210(1): 1–7.
21. Kastelic J., Galeski A., Baer E. The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 1978; 6(1): 11–23.
22. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10(6): 312–320.