

# Über die Bestimmung von Langperioden-Änderungen am Kollagen

On the Determination of Changes in the Large Periodic Structure of Collagen

Th. Nemetschek, R. Jonak, H. Nemetschek-Gansler, H. Riedl

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, Abteilung für Ultrastrukturforschung und

G. Rosenbaum

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie, Heidelberg/Hamburg

Z. Naturforsch. **33 c**, 928–936 (1978); eingegangen am 21. Juni, 1978

## Low Angle x-Ray Diffraction, Synchrotron x-Ray, Collagen Long Spacing

Changes in the large periodic structure of collagen were investigated with the aid of synchrotron radiation. Following results were obtained:

- 1) Macroscopic extension results in elastic deformation of the elements which are determinant for the structure.
- 2) The increase of the large period is not proportional to the macroscopic stress.
- 3) The interpretation of these facts requires a mechanical coupling between the structural units. Up to extensions of 4% this coupling is produced by means of a viscoelastic matrix.
- 4) In all probability the polypeptide helices are deformed in an inhomogeneous mode.

The results were set against measurements on human tendon and on artificially crosslinked collagen. The relations between the mechanical behaviour and the change of the large period were compared with the properties of a mathematical model.

## Einleitung

Die für native Kollagenfasern in der Kleinwinkelröntgenbeugung zu registrierende Langperiode von 670 Å beruht auf einer Parallelaggregation gegeneinander versetzter ~2900 Å langer Monomereinheiten [1] zu ~38 Å dicken Subfibrillen [2]. Im elektronenmikroskopischen Bild findet man aus Gründen, die mit der Präparation der Objekte zusammenhängen, hingegen häufig von 670 Å verschiedene Identitätsperioden [3]. Die bislang größte Abweichung wurde dabei an einer unter der Einwirkung des Elektronenstrahls gedehnten Fibrille mit einer Langperiode von ~1200 Å bei erhalten gebliebener unterteilter Querstreifung gefunden [3]. Die eine Fibrille aufbauenden Dreierschraubenformationen können somit eine beträchtliche Längung erfahren ohne erkennbare Störung struktureller Merkmale. An gleichfalls trockenem Kollagen wurde schließlich auch mit Hilfe der Röntgenbeugung eine mit der Faserdehnung ansteigende Langperiode gemessen [4]. An nativ feucht gedehnten Fasern konnte hingegen dieser Befund nicht bestätigt werden [5], weshalb zunächst ein inhomogenes Dehnungsverhalten [6] für Kollagen angenommen wurde. Da jedoch bei viskoelastischen Stoffen wie Kol-

lagen Zeiteffekte eine große Rolle spielen können, lag es auch nahe, das Ausbleiben einer Langperiodenänderung auf die beim Einsatz konventioneller Röntgenröhren erforderlichen langen Expositionzeiten zurückzuführen. Aus diesem Grunde wurden die Messungen unter Einsatz der Synchrotronstrahlung fortgesetzt, da hierdurch eine Verkürzung der Expositionzeiten um den Faktor 10<sup>3</sup> erzielt werden kann [7]. Auf diese Weise gelang es bereits zu zeigen, daß nativ feuchte Fasern unter Spannung eine elastische Verformung ihrer strukturtragenden Einheiten erfahren [8]. Im folgenden soll nun über weitere Meßergebnisse berichtet werden.

## Material und Methoden

Als *Untersuchungsmaterial* dienten Kollagenfasern aus Rattenschwanzsehnen unterschiedlichen Alters. Die schonend frei präparierten Fasern wurden unter Haemaccel® oder Ringerlösung bei ~2 °C aufbewahrt. Der native Zustand wurde bei allen Messungen ebenfalls unter diesen Flüssigkeiten aufrecht erhalten.

*Röntgenbeugung* unter Einsatz der Cu-K<sub>α</sub>-Strahlung von Hochleistungsröntgenröhren bei Verwendung von Kiessig- und Kratky-Kammern mit Filmregistrierung.

Die *Synchrotronstrahlung* wurde am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg unter

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Th. Nemetschek, Pathologisches Institut der Universität, Abteilung für Ultrastrukturforschung, Postfach 10 43 40, D-6900 Heidelberg 1.

Verwendung der von Leigh und Rosenbaum [9] beschriebenen Kleinwinkelröntgenanlage eingesetzt. Die in einer fernbedienten Küvette befestigte nativ feuchte Faser wurde dabei mit dem Strahlenquerschnitt jeweils zur Deckung gebracht.

Die Spektren wurden mit einem positionsempfindlichen Zähler unter Verwendung einer Argon/Methan-Füllung registriert. Auf diese Weise konnte das gesamte Beugungsspektrum gleichzeitig registriert werden, wodurch Schwankungen der Primärintensität keinen Einfluß auf die relativen Reflexintensitäten haben. Weiterhin ist es möglich, im Zeitraum, in dem man mit der herkömmlichen Methode einen Meßpunkt registrierte, den Gesamtverlauf des Spektrums zu ermitteln. Aufgrund dieser Empfindlichkeit und in Verbindung mit der hohen Primärstrahlintensität erhält man schon nach Zählzeiten von  $\sim 100$  sec hochauflöste Spektren. Die große Genauigkeit der Peak-Auswertung von  $\sim 0,3\%$  ergab sich außerdem durch eine spezielle Auswertemethode [10].

Um die Fasern definiert vordehnen zu können, mußten die Querschnitte vorher bestimmt werden. Bei bekanntem Verlauf der Spannungs/Dehnungskurven konnten so die Spannungswerte ermittelt werden, die bestimmten Dehnungen entsprachen.

Die Querschnittsbestimmung erfolgte an lichtoptischen Aufnahmen von Gefrierschnitten auf gravimetrischem Wege und in jüngster Zeit mit dem elektronischen Flächenmeßgerät DIGIPLAN der Firma Kontron. Die elektronenmikroskopische Durchmusterung von Dünnschnitten verstreckter Brillen erfolgte mit dem Elmiskop Ia von Siemens.

## Ergebnisse

### Kurzzeitmessungen bei konstanter Spannung

Damit eine elastische Deformation der strukturtragenden Elemente während der Messungen mit der

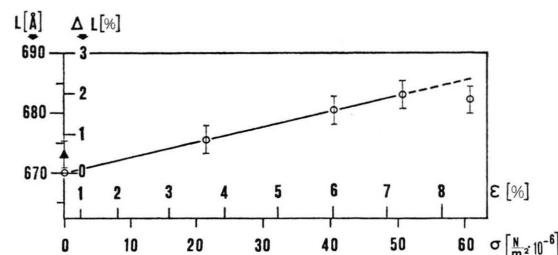


Abb. 1. Änderung der Langperiode einer 22 Mo alten nativen Faser im Bereich von 3,5 bis 8,5% Faserdehnung (○) und nach Entlastung auf die Spannung 0 (▲).

Synchrotronstrahlung aufrecht erhalten bleibt, muß die Faser für diese Zeit unter der Einwirkung einer konstanten Spannung stehen. Eine Probe wurde hierzu auf 3,5, 6,7 und 8,5% verstreckt und jeweils vermessen und im Anschluß daran wieder auf 0 entspannt. In Abb. 1 ist nun die Langperiode in Abhängigkeit von der Spannung aufgetragen, ebenso auch die zugeordnete Dehnung, die wegen des „Fußes“ in der  $\sigma$ - $\epsilon$ -Kurve zu Beginn nicht linear ansteigt. Nach Entlasten der Faser blieb die Langperiode zunächst noch 0,5% über dem Ausgangswert, stellte sich jedoch nach wenigen Minuten Wartezeit wieder auf 670 Å ein. Da wie aus Abb. 1 hervorgeht, die Langperiode ab 7% Faserdehnung nicht mehr linear anzusteigen scheint, sowie zur Erfassung der Langperiodenänderung bei geringer Dehnung erschien es notwendig, eine Faser auch in kleineren Schritten bis zu großen  $\epsilon$ -Werten zu dehnen und zu vermessen. Abb. 2 zeigt die Langperiodenänderungen im experimentell erfaßbaren Bereich von 0 bis 11% Faserdehnung. Die Kurve läßt sich durch drei Geraden unterschiedlicher Steigungen annähern. Diese Steigungen, die ein Maß dafür sind, wie stark sich die Langperiode mit der an der Faser anliegenden Spannung ändert, verhalten sich wie 5:9:6.

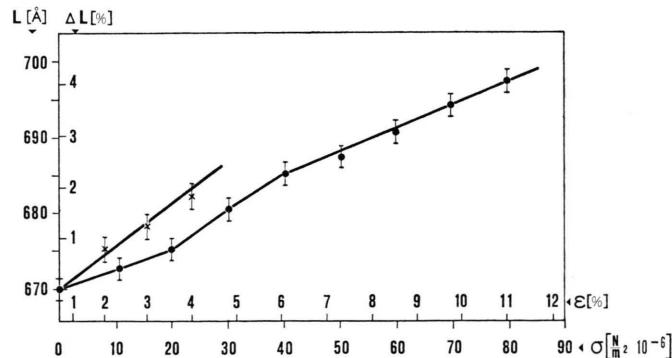


Abb. 2. Vergleich der  $\epsilon$ -L-Kurven von 8 Wo (×) und 22 Mo (●) alten Fasern aus Rattenschwanzsehnen.

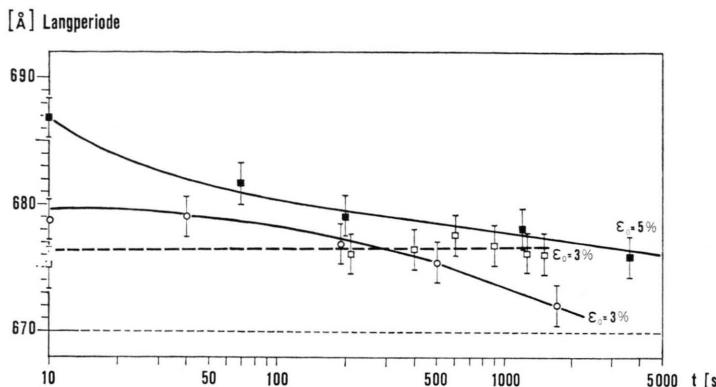


Abb. 3. Änderung der Langperiode als Funktion der Zeit bei konstanter Spannung an 6 (○) und 24 Mo (□, ■) alten Fasern. Die Expositionzeiten lagen zwischen 50 sec zu Beginn der Messungen und 200 sec nach längeren Wartezeiten.

#### Langzeitmessungen bei konstanter Spannung (Retardationsmessungen)

Aufgrund der unter Einsatz konventioneller Röntgenstrahlung gemachten Erfahrungen war zu erwarten, daß sich bei konstanter Spannung die Langperiode als Funktion der Zeit ändert. Um dies zu überprüfen, wurde die Vorspannung über einen längeren Zeitraum hinweg konstant gehalten, innerhalb dessen die Langperiode mehrere Male röntgenographisch vermessen wurde. Untersucht wurden 24 Mo alte Fasern aus Rattenschwanzsehnen bei Anfangsdehnungen von 3 und 5%, sowie eine 6 Mo alte Faser bei einer Anfangsdehnung von 3% (Abb. 3). Die bei 5% Anfangsdehnung auf 686 Å angestiegene Langperiode einer 24 Mo alten Faser fällt direkt nach Anlegen der Spannung zunächst stark ab und verkürzt sich dann weiter, nunmehr jedoch mit verminderter Geschwindigkeit. So liegt die Langperiode noch nach einer Stunde etwa 1% über dem Ausgangswert von 670 Å. Bei einer Anfangsdehnung von 3% zeigte die Faser ein völlig anderes Verhalten. Und zwar bleibt der Anfangswert während der ersten halben Stunde nach Anlegen der Spannung nahezu konstant. Inwieweit das registrierte Maximum bei 600 sec darauf hindeutet, daß sich hierbei die Langperiode mit dem maximalen Wert nur verzögert einstellt, muß noch überprüft werden, da dieser Effekt knapp innerhalb der Fehlerbreite liegt.

Die vergrößerte Langperiode der 6 Mo alten Faser fällt schon nach  $\sim 1000$  sec nahezu auf den Ausgangswert ab, obwohl sie bemerkenswerterweise direkt nach Anlegen der Spannung größer als die der 24 Mo alten Faser ist. Dieser Befund weist in die gleiche Richtung wie die  $\varepsilon$ -L-Messungen in Abb. 2, bei denen die Langperiodenbestimmung direkt nach Anlegen der Spannung ausgeführt wurde und es sich

zeigte, daß beim jungen Kollagen die Langperiode mit zunehmender Dehnung stärker ansteigt als beim alten Kollagen.

Besonders gering ist die Langperiodenänderung als Funktion der Dehnung bei Fasern aus einer menschlichen Handbeugesehne (Abb. 4). Bei einer Faserdehnung von 7% ändert sich hier die Langperiode um  $\sim 1,5\%$ ; dieselbe makroskopische Dehnung bewirkt hingegen bei einer 22 Mo alten Rattenschwanzfaser (s. Abb. 2) bereits eine Langperiodenänderung von 2,6%.

#### Langzeitmessungen an künstlich vernetzten Fasern

Im Unterschied zu nativ feuchten Fasern gelingt es an künstlich vernetztem Kollagen, Langperiodenänderungen bereits mit Hilfe der konventionellen Röntgenbeugung zu erfassen. Der Ausgangswert ist dabei durch eine Aldehydfixierung nicht beeinflußt; interessanterweise führen jedoch diese Objekte zu charakteristischen Abweichungen der Intensitätsverteilung der meridionalen Kleinwinkelreflexe [11].

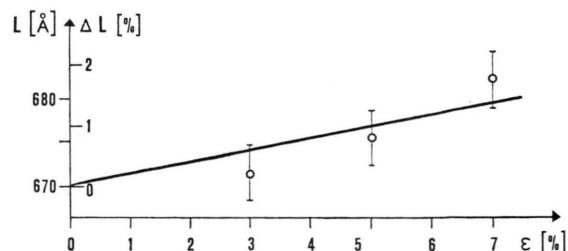


Abb. 4. Änderung der Langperiode als Funktion der Dehnung bei einer Faser aus einer Handbeugesehne eines 54-jährigen Mannes.

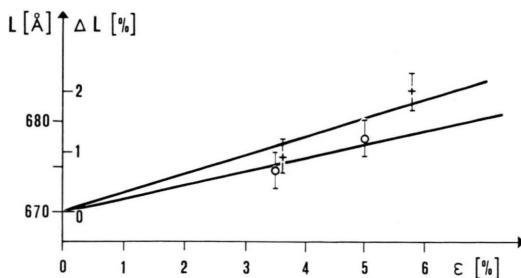


Abb. 5. Änderung der Langperiode als Funktion der Dehnung bei verstreckt vernetzten 24 Mo alten Fasern ( $\circ$ : Formaldehyd;  $+$ : Glutaraldehyd) Expositionzeit:  $\approx 20$  h.

In Abb. 5 sind nun die Änderungen der Langperiode als Funktion der Dehnung wiedergegeben. Bei diesem Versuch muß jedoch berücksichtigt werden, daß unter den eingetragenen Dehnungen Restdehnungen nach 20 h Exposition zu verstehen sind. Es war nicht möglich, Dehnungen  $> 6\%$  über längere Zeit aufrecht zu halten, da die Proben während der Exposition rissen.

#### Kurzzeitmessungen bei konstanter Dehnung (Relaxation)

Um über spannungsbedingte Deformationen der Dreierschrauben weitere Informationen zu erhalten, wurde ein Relaxationsversuch ausgeführt, in dessen Verlauf die Langperiode wiederholt vermessen wurde (Abb. 6). Die ausgerichtete nativ feuchte Faser wurde hierzu um  $6\%$  vorgedehnt und für die Dauer der 1. Exposition (100 sec) die Spannung konstant gehalten. Die nächsten Aufzeichnungen wurden in kürzeren Zeiten (30 sec) gemacht, um die Langperiodenänderung während der Exposition möglichst gering zu halten. In dieses Diagramm wurde außerdem auch die Änderung der an der Faser anliegen-

den Spannung (Relaxationskurve) eingetragen. Man erkennt, daß die Spannung mit einer größeren Zeitkonstante abfällt als die Langperiode.

Soweit es aus technischen Gründen möglich war, wurden parallel zu den meridionalen Kleinwinkelreflexen auch die meridionalen Weitwinkelreflexe vermessen. Allerdings mußte hierbei auf Filmmaterial registriert werden, woraus sich um den Faktor 3 längere Expositionszeiten (300 sec) ergaben (Abb. 7). Im Falle einer um  $5\%$  verstreckten Faser wurde eine Vergrößerung der  $2,86 \text{ \AA}$  Periode auf  $2,875 \text{ \AA}$  registriert, entsprechend einer Zunahme von  $0,5\%$ . Die Langperiode änderte sich bei der gleichen Dehnung bereits um  $1,5\%$ .

In Abb. 8 sind Fibrillenlängsschnitte aus einer Faser wiedergegeben, die in unfixiertem Zustand nach Entwässerung unter monomerem Epoxiharz um  $\sim 3\%$  verstreckt und anschließend zur Aushärtung gebracht wurde. Man erkennt schräg gestellte und zueinander versetzte Einzelstreifen bei größtentheils erhalten gebliebener hochunterteilter Querstreifung, als einen weiteren Hinweis darauf, daß auch bei anscheinend reinen Zugversuchen Scherkräfte in der Probe auftreten können [12]. Bei Erhebung dieses Befundes wurde darauf geachtet, daß eine Schrägstellung des Streifenmusters nicht durch einseitige mechanische Belastungen des Dünnschnittes hervorgerufen sind, wie sie z. B. durch Schnitt- oder/und Trägerfilmrisse verursacht sein können. Aus dem ermittelten Gangunterschied zueinander versetzter Querstreifen (Abb. 8 b) errechnet sich eine mittlere Verschiebung zweier Subfibrillen von  $7-8 \text{ \AA}$  und eine maximale Verschiebung von  $10$  bis  $11 \text{ \AA}$ . An dem in Abb. 8 b angezeigten Gangunterschied sind somit in einer Ebene  $\sim 3$  Subfibrillen beteiligt.

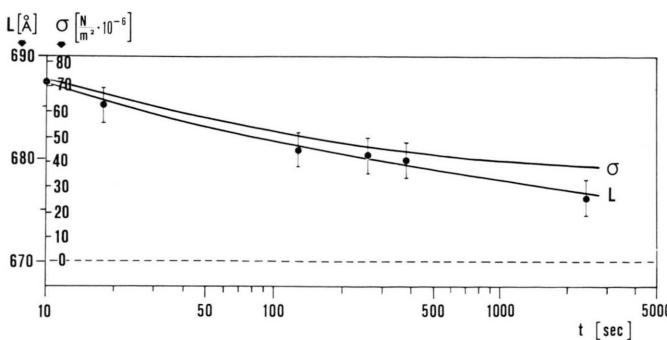


Abb. 6. Abnahme der Langperiode einer Faser mit konstanter Vordehnung als Funktion der Zeit. Die Relaxationskurve der Faser ist ebenfalls eingezeichnet.

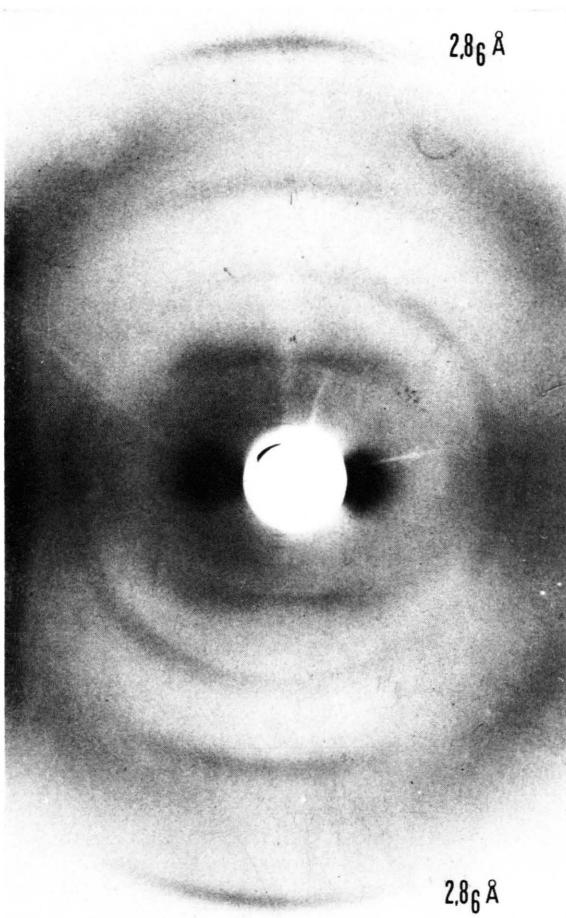


Abb. 7. Weitwinkelröntgendiagramm einer ausgerichteten, aber noch nicht verspannten Kollagenfaser. Mit Rücksicht auf die Registrierung der Meridianreflexe mußte der Äquator überstrahlt werden. Der Doppelring röhrt von der Hostaphan R 6-Folie des Küvettenfensters her. Synchrotronstrahlung; Abstand Präparat Film: 75,4 mm; Expositionzeit 300 sec.

## Diskussion

Aus den mit der Synchrotronstrahlung im meridionalen Kleinwinkelbereich erzielten Ergebnissen geht hervor, daß sich der  $670 \text{ \AA}$ -Reflex nativ feuchter Fasern mit zunehmender Spannung nach größeren  $\text{\AA}$ -Werten verschiebt, ohne jedoch einen mit der Spannung proportionalen Anstieg zu zeigen. Weiterhin geht hervor, daß die den strukturtragenden Elementen bei der Faserdehnung aufgezwungene Deformation reversibel und somit elastisch ist.

Daß kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Langperiodenänderung und Spannung besteht, erbrachte bereits ein Relaxationsversuch [5] an um

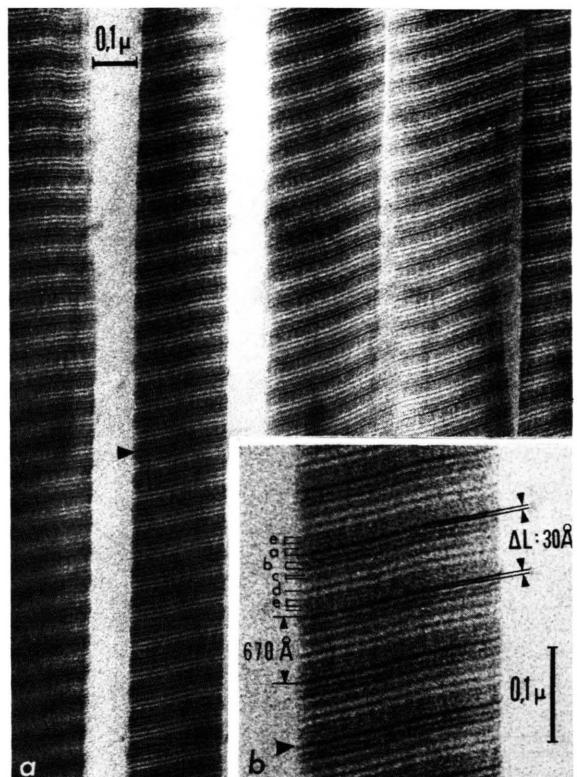


Abb. 8. Fibrillenlängsschnitte aus einer verstreckt eingebetteten Faser. Man beachte schräg zur Fibrillenachse verlaufende Querstreifen und in b Streifenversetzungen (►: gleiche Objektbereiche). Die Strukturäquivalente der Querstreifen im unteren Teil der linken Fibrille dürften eine Verkippung in Strahlrichtung erfahren haben. Nachkontrastierung mit PWS und  $\text{UO}_2\text{-Acetat}$ . 2471/74; elektronenopt.: 18000:1.

$\sim 10\%$  verstreckten nativen Fasern. Nach 15,5 Stunden konnte unter isometrischen Bedingungen noch eine Spannung in Höhe von  $\sim 25\%$  des Ausgangswertes gemessen werden. Nach den Ergebnissen mit der Synchrotronstrahlung entspräche eine solche Restspannung einer Langperiodenänderung von  $\approx 1\%$  (Abb. 2). Da die mit der konventionellen Röntgenstrahlung gemachten Kleinwinkelmessungen Expositionszeiten erfordern, die mit der Dauer des angeführten Relaxationsexperimentes übereinstimmen, müßte eine zu Expositionsbeginn um 10% verstreckte Faser noch eine Langperiodenänderung zeigen. Bekanntlich ist dies aber nicht der Fall. Der Befund, wonach die Langperiode bei konstanter Dehnung als Funktion der Zeit schneller abfällt als die Spannung, findet schließlich auch durch Abb. 6 seine Bestätigung.

Zur Deutung dieser Befunde ist es erforderlich, davon auszugehen, daß die strukturtragenden Elemente in eine mit diesen in Wechselwirkung stehende Zwischensubstanz eingebettet sind. Diese z. B. aus Proteoglykanen bestehende viskoelastische Matrix dürfte eine mechanische Kopplung gewährleisten und dafür verantwortlich sein, daß die Fibrillen bei schneller Dehnung der Faser ebenfalls mit gelängt werden, sich dann jedoch nach Ablauf einer bestimmten Zeitspanne kontrahieren können, selbst wenn in der ebenfalls relaxierenden Matrix (s. Abb. 10  $\eta_1$  und  $\eta_2$ ) noch eine Restspannung vorhanden ist. Hält man dabei die Meßzeiten kurz, so haben die Subfibrillenbündel bzw. Fibrillen keine Zeit sich in der Matrix zu entspannen. Sie folgen der Deformation zwischenmolekularer Substanzen, jedoch nicht im gleichen Ausmaß. Der Proportionalitätsfaktor, der beide Dehnungsbeträge verknüpft, schwankt zwischen 0,3 und 0,45 (Abb. 2). Im Falle der Subfibrillen wird die durch eine aus  $H_2O$ -Assoziate bestehende Matrix vermittelte Wechselwirkung ab einem Dehnungsbetrag von 4% von einem weiteren Mechanismus überlagert, wiedergespiegelt in einer Steigungsänderung der  $\Delta L$ - $\sigma$ -Kurve in Abb. 2. Es liegt nun nahe, diesen Effekt mit dem aufgefundenen

„Knick“ [13] im Spannungs/Dehnungs-Diagramm (Abb. 9 f) in Verbindung zu bringen. Im molekularen Bereich läßt sich dieser Ablauf stark idealisiert (Abb. 9) folgendermaßen erklären: Bis zu einer Dehnung um 4% erfolgt eine mechanische Kopplung der Subfibrillen überwiegend über durch H-Brücken stabilisierte  $H_2O$ -Assoziate; erst ab 4% Dehnung erfolgt der Kraftfluß auf die Subfibrillen auch über die inzwischen maximal verstreckten intersubfibrillären Vernetzungspептиde [2], verbunden mit einer verstärkten Zunahme der Langperiode (Abb. 9 c) entsprechend der 2. Steigung im Proportionalbereich der Kurve in Abb. 9 f.

Der in Abb. 9 b skizzierten Deformation entsprechen im elektronenmikroskopischen Bereich (Abb. 8) Fibrillen mit schräg oder versetzt verlaufenden Querstreifen als Äquivalenzbild des angedeuteten Gleitvorgangs der Subfibrillen.

Die 2. Steigungsänderung in der  $\Delta L$ - $\sigma$ -Kurve der 22 Mo alten Faser (Abb. 2) könnte darauf beruhen, daß erst ab einem bestimmten Dehnungsbetrag auch intramolekulare Vernetzungen der Dreierschrauben ansprechen und hierdurch zu einer anderen Federkonstante dieser Einheiten führen. Auffälligerweise findet man an jungen Fasern in der  $\epsilon$ - $L$ -Kurve

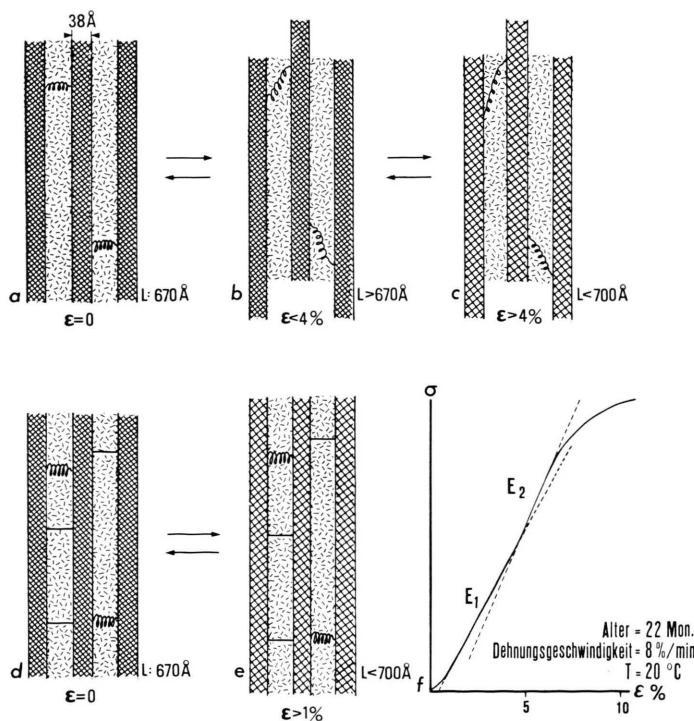


Abb. 9. Stark idealisierte schematische Darstellung des Dehnungsablaufs an nativem und künstlich vernetztem Kollagen. Die schraffierten Balken stellen Subfibrillen oder Fibrillen dar; die Zwischenräume sind bewußt zu groß eingezeichnet. a) Über  $H_2O$ -Assoziate und Vernetzungspептиde mechanisch gekoppelte und stabilisierte 38 Å-Einheiten (Subfibrillen) bzw. über eine Matrix mechanisch gekoppelte und stabilisierte Fibrillen im entspannten und b) in bis 4% dehntem Zustand. Die zwischenmolekularen Substanzen sind verspannt, die Vernetzungspептиde der Subfibrillen sind jedoch erst gestreckt. c) Bei > 4% Dehnung Kraftfluß auf die Subfibrillen nunmehr auch über maximal verspannte Vernetzungspептиde. d) Zusätzliche Stabilisierung der Subfibrillen und Fibrillen über künstliche Querbrücken; e) Blockierter Gleitmechanismus mit voller Kraftübertragung bei Dehnung auf die Subfibrillen; f) Spannungs-Dehnungs-Diagramm einer nativ feuchten Faser unter Haemaccel.

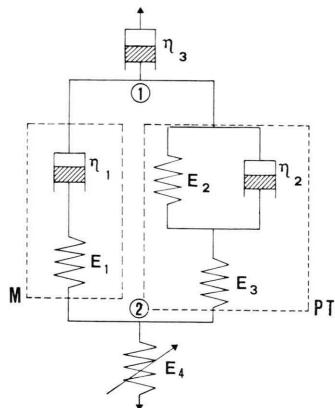


Abb. 10. Modellkonstruktion zur Simulation der mechanischen Eigenschaften von Kollagen und des Verhaltens der Langperiode bei Dehnungen  $< 4\%$ .  $E_1$ : Subfibrillen bzw. darin enthaltene Dreierschrauben.  $E_2$ : Intermolekulare Vernetzungen.  $E_3$ : Elastizität zwischenmolekularen Substanzen (Matrix).  $E_4$ : Die Faserwelligkeit angebende Feder mit variablem E-Modul.  $\eta_1$ : Reibungskräfte zwischen Subfibrillen.  $\eta_2$ : Reibungskräfte zwischen Fibrillen und Verschiebung der Fibrillen in der Matrix.  $\eta_3$ : Langzeitfließen. M: Maxwell-Element. PT: Pointing-Thomson-Element.

nur einen geradlinigen Verlauf, entsprechend einer einheitlichen Federkonstante der Dreierschraube und als Hinweis auf eine noch nicht abgeschlossene intramolekulare Stabilisierung.

In Abb. 10 ist nun zur Simulation der mechanischen Eigenschaften von Kollagen und der bei Dehnungen  $< 4\%$  zu registrierenden Langperiodenänderungen eine Modellkonstruktion wiedergegeben. Die rechte Seite dieses Modells (PT) „ $E_2$ “, „ $E_3$ “, „ $\eta_2$ “ gibt dabei das makroskopische Verhalten einer Faser wieder, während der linke M-Zweig („ $E_1$ “ und „ $\eta_1$ “) vorwiegend die molekularen Abläufe beschreiben soll. Eine Trennung der beiden Betrachtungsebenen erweist sich als notwendig, da z. B. beim Relaxationsversuch die Langperiode schneller abfällt als es dem makroskopischen Spannungsabfall entspricht (Abb. 6). Das Dämpfungselement „ $\eta_1$ “ gibt die Reibungsverhältnisse zwischen den Subfibrillen in der Matrix wieder, die in diesem Fall aus einer nahezu monomolekularen Umhüllung von Wasserassoziaten besteht. Das mit „ $\eta_2$ “ bezeichnete Element beschreibt die Reibung der Fibrillen untereinander (s. die z. T. engen interfibrillären Zwischenräume in Abb. 8), sowie mit einer aus Proteoglykanen und feinsten Fibrillen bestehenden Matrix. Eine mit der Faserdehnung verbundene Querschnittskontraktion wird dabei zu einer Erhöhung der zu erwartenden Reibungskräfte führen.

Zu Beginn der Dehnung wird die Feder „ $E_4$ “ verformt; sie besitzt einen variablen E-Modul, der mit wachsendem Dehnungsbetrag zunimmt. Bei einer Dehnung von 1 bis 2% (gestreckte Faser) ist die Spannung so groß geworden, daß nun auch das aus „ $E_1$ “, „ $E_2$ “, „ $E_3$ “, „ $\eta_1$ “ und „ $\eta_2$ “ bestehende System in zunehmendem Maße verformt wird. Da nun bei jugendlichem Kollagen die intramolekulare Stabilisierung der Dreierschrauben einer Subfibrille noch nicht abgeschlossen ist, besitzt die Federkonstante „ $E_1$ “ einen niedrigeren Wert als bei alten Fasern. Bei gleicher Dehnungsgeschwindigkeit längt sich daher „ $E_1$ “ bei 6 Mo alten Fasern stärker als bei 24 Mo altem Kollagen, ausgedrückt in einem Anstieg der Langperiode in den Abb. 1 und 3.

Wegen der geringen Zeitdauer, die die Zug-Dehnungsexperimente in Anspruch nehmen, spielt hier das Fließen von „ $\eta_3$ “ noch keine Rolle.

Hält man nun den Dehnungsbetrag konstant (Relaxation), so fließen die Dämpfungselemente „ $\eta_1$ “ und „ $\eta_2$ “. Hierbei fließt „ $\eta_2$ “ so lange, bis die an den Federn „ $E_2$ “, „ $E_3$ “ und „ $E_4$ “ anliegenden Kräfte gleichgroß sind. Zu Beginn dieses Vorganges kann sich die Langperiode geringfügig längen, da sich durch das Fließen der Abstand zwischen den Punkten ① und ② vergrößert, was zur Dehnung von „ $E_1$ “ führen kann. In der Nähe des Gleichgewichtszustandes gewinnt jedoch der Fließvorgang in „ $\eta_1$ “ das Übergewicht, die Feder „ $E_1$ “ entspannt sich auf die Spannung 0, d. h. die Langperiode geht auf den Ausgangswert zurück. Ein Spannungsabfall nach langen Zeiten kann auf das Fließen von „ $\eta_3$ “ zurückgeführt werden.

Bei Konstanthalten einer Spannung (Retardation) fließen „ $\eta_1$ “ und „ $\eta_2$ “ ebenfalls. „ $\eta_2$ “ fließt solange, bis die auf das Gesamtsystem einwirkende Spannung auch an den Federn „ $E_2$ “, „ $E_3$ “ und „ $E_4$ “ anliegt. Parallel hierzu kann ein Anstieg der Langperiode erfolgen (ausgeprägter als bei der Relaxation); sobald das System jedoch in die Nähe des Gleichgewichtszustandes kommt und der Abstand der Punkte ① und ② sich nurmehr langsam vergrößert, überwiegt das Fließen von „ $\eta_1$ “ und die Feder „ $E_1$ “ kontrahiert sich, d. h. die Langperiode geht auf den Ausgangswert zurück. Im Gleichgewichtszustand ( $\sigma = \text{const.}$ ) bleibt der Abstand zwischen ① und ② konstant; das nach längeren Zeiten (Stunden) beobachtbare minimale Fließen kann auf eine Deformation von „ $\eta_3$ “ zurückgeführt werden. Zur Bestimmung der Abstandsänderung der Punkte ① und ②

deren Kenntnis auch Aufschluß über das zeitliche Verhalten der Langperiode gibt, müssen simultan die Zustandsgleichungen der M- und PT-Elemente gelöst werden. Dieses Verfahren führt jedoch zu Differentialgleichungen, die nicht in geschlossener Form lösbar sind [14]. In Näherung nimmt man an, daß das mechanische Verhalten vorwiegend durch das PT-Element bestimmt wird, während das M-Element passiv verformt wird. Eine Bedingung dafür, daß das Gesamtsystem in der beschriebenen Weise aufgetrennt werden kann, besteht darin, daß „ $\eta_2$ “ > „ $\eta_1$ “ gilt. Dies geht u. a. aus der Tatsache hervor, daß die Langperiode der Dehnung nicht direkt folgt, sondern mit einem Proportionalitätsfaktor < 0,5. Zur leichteren Berechnung wird die Feder „E<sub>3</sub>“ durch eine feste Verbindung ersetzt. Hierdurch verändert sich das Retardationsverhalten nur unwesentlich. Mit den oben gemachten Einschränkungen erhält man nun für die anliegende Spannung den Ausdruck:

$$\sigma(t) = A \cdot \exp(-t \cdot E_1/\eta_1) + B[\exp(-t \cdot E_2/\eta_2) - \exp(-t \cdot E_1/\eta_1)].$$

Hierbei gibt  $\sigma(0) = A$  die Spannung an, die zu Beginn des Retardationsversuchs herrscht; für  $t \rightarrow \infty$  verschwindet die Spannung, was die experimentellen Tatsachen richtig wiedergibt.  $A \exp(-t \cdot E_1/\eta_1)$  gibt die Spannungsänderung am M-Element bei konstanter Dehnung (Relaxation) an; da man weiterhin zeigen kann, daß der zweite Term positiv ist, kann man ihn deshalb als den Anteil interpretieren, um den sich durch das Fließen die Spannung von „E<sub>1</sub>“ vergrößert, was mit einer verzögerten Einstellung des Ausgangswertes der Langperiode gleichzusetzen ist. Erste Beobachtungen scheinen ein solches Verhalten zu bestätigen.

Die Einwirkung wäßriger Aldehydlösungen auf die Fasern bewirkt durch zusätzliche intermolekulare und interfibrilläre Querbindungen (Abb. 9 b) offensichtlich auch eine Änderung der viskoelastischen Eigenschaften des Systems, derzufolge nunmehr die Langperiode als Funktion der Dehnung auch mit Hilfe der herkömmlichen Röntgenbeugung registriert werden kann (Abb. 5); so war eine durch Faserdehnung erzielte Langperiodenänderung nach 20 h Expositionszeit zu beobachten. Vergleichbar hohe Dehnungen wie an nativem Material waren jedoch wegen des um ~95% angestiegenen E-Moduls und der durch die erhöhte Vernetzungsdichte

bedingten Abnahme der Verstreckungsfähigkeit nicht möglich.

Sowohl an nativen als auch an künstlich vernetzten Fasern blieb eine Dehnung ohne Einfluß auf die relativen Intensitäten der meridionalen Kleinwinkelreflexe, als Beweis dafür, daß während der Längenänderung der zur Röntgenbeugung beitragenden Einheiten die Elektronendichtevertteilung in der Langperiode und somit die versetzte Parallelausrichtung der Dreierschrauben unbeeinflußt bleiben.

Ähnlich wie schon bei der Dehnung trockener Fasern beobachtet [4], ist auch bei nativ feucht verspannten Objekten die Änderung des meridionalen Weitwinkelreflexes geringer als die Änderung der Langperiode. Wie aus den Relaxationsversuchen in Abb. 6 zu ersehen ist, liefern die unterschiedlichen Expositionzeiten (300 sec gegenüber 100 sec bei den Kleinwinkelspektren) keine plausible Erklärung für diese Diskrepanz. Eine Erklärung bietet hier die Theorie von Bonart [15], wonach bei inhomogenen Dehnungen eines Gitters die Reflexlage erhalten bleiben kann, während sich allerdings das Reflexprofil ändert. Nun erscheint es einsichtig, daß die Kollagen-Dreierschrauben sich in der Tat nicht homogen dehnen [6], sondern möglicherweise abschnittsweise verschiedene E-Moduln besitzen, nicht zuletzt wegen des Gehaltes an den Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin. Allerdings müßte eine solche inhomogene Längung der Polypeptidschrauben eine Änderung der Reflexbreite zur Folge haben. Wegen der relativ großen Halbwertsbreite des die Länge eines Aminosäurerestes in der Projektion auf die Schraubenachse anzeigen 2,86 Å-Meridionalreflexes (Abb. 7), dürfte sich aber eine solche Verschmierung der Beobachtung entziehen.

Abschließend bleibt noch hervorzuheben, daß die aufgezeigte Möglichkeit, Kurzzeitmessungen an unter mechanischer Belastung stehenden nativen Kollagenfasern auszuführen, erstmalig den Weg für die Simulation und röntgenographische Erfassung plötzlich einsetzender klinisch relevanter Kollagenstörungen öffnet.

Herr Prof. Dr. H. B. Stuhrmann, EMBL Hamburg, danken wir für Meßzeiten am DESY.

Für ihre Mitarbeit danken wir Frau U. Wald und Fräulein U. Pretzsch. Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Schwerpunktprogramm: Biopolymere und Biomechanik von Bindegewebssystemen.

- [1] K. Kühn, Naturwissenschaften **54**, 101 (1967).
- [2] Th. Nemetschek, R. Bowitz u. H. Nemetschek-Gansler, Verh. Dtsch. Path. Ges. **59**, 34 (1975).
- [3] Th. Nemetschek, W. Graßmann u. U. Hofmann, Z. Naturforsch. **10 b**, 61 (1955).
- [4] J. T. Randall, J. Soc. Leather Trades Chem. **38**, 362 (1954).
- [5] R. Bowitz u. Th. Nemetschek, 7. wissenschaftl. Konf. d. Ges. Dtsch. Naturforscher u. Ärzte 125 (1974).
- [6] R. Hosemann, R. Bonart u. Th. Nemetschek, Colloid Poly. Sci. **252**, 912 (1974).
- [7] G. Rosenbaum, K. C. Holmes u. J. Witz, Nature **230**, 434 (1971).
- [8] R. Bowitz, R. Jonak, H. Nemetschek-Gansler, Th. Nemetschek u. H. Riedl, Naturwissenschaften **63**, 580 (1976).
- [9] J. B. Leigh u. G. Rosenbaum, Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **5**, 239 (1976).
- [10] H. Riedl u. Th. Nemetschek, Sitzungsber. Heidelberg. Akad. Wiss. Math.-Naturwiss. Kl. (1977), S. 217, 5. Abh.
- [11] H. Riedl, E. W. Fischer u. Th. Nemetschek (in Vorbereitung).
- [12] Th. Nemetschek, R. Jonak, A. Meinel, H. Nemetschek-Gansler u. H. Riedl, Arch. orthop. Unfall-Chir. **89**, 249 (1977).
- [13] R. Bowitz, H. Nemetschek-Gansler, Th. Nemetschek u. O. Schiller, Naturwissenschaften **62**, 493 (1975).
- [14] H. Riedl, R. Jonak u. Th. Nemetschek, Biology of collagen (ed. A. Viidik) (i. Druck).
- [15] R. Bonart, Progr. Colloid Polym. Sci. **58**, 36 (1975).