

# КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ

УДК 612.015.36:547.962.9]:612.6.052:575.224.22

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛАГЕНА ГИПЕРТРОФИЧЕСКИХ И КЕЛОИДНЫХ РУБЦОВ

О.В.ПОДОБЕД, Н.Н.ПРОЗОРОВСКАЯ, Е.А.КОЗЛОВ, Т.А.ЦВЕТКОВА,  
С.И.ВОЗДВИЖЕНСКИЙ, А.А.ДЕЛЬВИГ

Институт биомедицинской химии Российской Академии медицинских наук, 119832, Москва,  
Погодинская, 10, Московский НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РСФСР.

Проведено исследование состава коллагена и его поперечных сшивок со структурой пиридинолина в ткани келоидных и гипертрофических послеожоговых рубцов различного возраста. Во фракциях растворимого коллагена, выделенного из рубцов ткани детей в возрасте от 1 до 7 лет после травмы, определяли процентное содержание коллагена типа III, отношение коллагеновых цепей  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  и отношение димеров ( $\beta$ -цепи) к мономерам ( $\alpha$ -цепи) в коллагене типа I. Сравнительный анализ молодых (около 1 года) гипертрофических и келоидных рубцов показал, что отношение  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  и  $\beta_{11}+\beta_{12}/\alpha 1(I)+\alpha 2(I)$  выше в гипертрофических рубцах. Повышенное в молодых гипертрофических рубцах относительное содержание  $\beta$ -цепей в пределах 7 лет после травмы приближается к значениям, характерным для нормальной кожи. Такого закономерного снижения отношения димеры/момеры коллагена типа I с возрастом келоидных рубцов обнаружено не было. Было выявлено снижение относительного содержания коллагена типа III в молодых келоидных рубцах по сравнению с гипертрофическими рубцами того же возраста ( $13 \pm 3$  и  $17 \pm 7$ , соответственно). Этот показатель оказался одинаковым в более старых рубцах. Среднее содержание пиридинолиновых сшивок в коллагене келоидов в 2 раза превышает это значение в коллагене гипертрофических рубцов. Полученные данные подтверждают предположение о том, что наряду с общими, существуют различные по характеру нарушения метаболизма коллагена в процессе формирования келоидных и гипертрофических рубцов.

Морфологические и биохимические исследования позволяют предположить, что образование келоидных и гипертрофических рубцов является следствием нарушения метаболизма соединительной ткани, которое приводит к несбалансированному накоплению ее макромолекулярных компонентов, в особенности коллагена, гликопротеинов, гликозаминогликанов и протеогликанов [1, 2]. Было отмечено, что в ткани келоидных рубцов меньше поперечносшитых молекул коллагена, чем в нормальной коже и в нормальных рубцах [3]. При этом рубцовая ткань содержит отсутствующие в нормальной коже поперечные связи со структурой пиридинолина [4]. Наряду с процессами внутри- и внеклеточного созревания коллагена, важная роль в нормальном фибриллогенезе отводится сбалансированному синтезу молекул коллагена типа I и типа III. Согласно предположению Fleischmajer et al. [5] коллаген типа III играет регуляторную роль в фибриллогенезе. Следует отметить, что в литературе имеется мало данных о том, какие изменения претерпевает коллаген с возрастом рубца. Для выяснения характера структурных изменений коллагена в зависимости от возраста патологических рубцов было проведено исследование соотношения коллагенов типа I и типа III, мономеров ( $\alpha$ -цепи) и димеров ( $\beta$ -цепи) коллагена типа I, а также содержания трифункциональных связей со структурой пиридинолина в гипертрофических и келоидных рубцах. Полученные результаты свидетельствуют о наличии как общих, так и специфических, зависящих от возраста рубцов, изменений исследованных показателей.

**Методика.** Образцы нормальной кожи были получены у детей, перенесших хирургические операции и не имевших послеожоговых рубцов (4 ребенка в возрасте 2, 5, 8 и 13 лет); образцы рубцовой ткани были получены при хирургическом иссечении гипертрофических (14) и келоидных (16) рубцов у детей в возрасте от 2 до 14 лет. Возраст рубцов варьировал от 6 месяцев до 13 лет; площадь рубца — от 0,15 до 13% от общей площади кожного покрова. Обозначение "гипертрофический" или "келоидный" рубец дано на основании клинического обследования по общепринятым критериям. В образ-

цах рубцовой ткани и нормальной кожи определяли отношение димеров и мономеров в коллагене типа I и отношение коллагена типа III и типа I, а в некоторых образцах рубцов и в нормальной коже содержание поперечной сшивки зрелого коллагена — пиридинолина.

**Анализ коллагена.** Коллаген из образцов кожи или рубцовой ткани экстрагировали 0,5 М раствором уксусной кислоты в присутствии пепсина (Sigma, США) в концентрации 100 мкг в мл с последующим осаждением HCl в конечной концентрации 2 М. Электрофоретическое разделение цепей коллагена проводили по методу, предложенному Сикесом [6], в 6,25% полиакриламидном геле. Гель после окрашивания Coomassie Blue R-250 сканировали на приборе Chromoscan 200 Scan 201 (Jouyce Loeble, Англия). Соотношение мономеров и димеров коллагена типа I и  $\alpha$ -цепей I и III типа вычисляли по площади соответствующих пиков.

**Определение пиридинолина.** Содержание пиридинолина в ткани определяли по методу, предложенному Eyre, Koob, Van Ness [7]. Ткань гидролизовали в 6 н HCl; пиридинолин отделяли от основной массы аминокислот хроматографией на сефадексе G-15 (Pharmacia, Швеция) и от других флуоресцирующих веществ — на ионообменной смоле Aminex Q-I55S (Bio-Rad, США). Концентрацию пиридинолина в элюатах измеряли на спектрофлуориметре Элюмин 300 при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 395 нм, используя в качестве стандарта пиридинолин, выделенный из ахиллова сухожилия быка. Содержание пиридинолина в ткани выражали в моль на моль коллагена, принимая, что 1 моль коллагена содержит 285 моль оксипролина [8]. Содержание оксипролина в тканях определяли после кислотного гидролиза колориметрическим методом [9].

Статистическая обработка данных. Достоверность различия средних проводили по критерию Стьюдента. Построение кривых зависимости определяемых показателей от возраста рубца осуществлялось методом наименьших квадратов.

Таблица 1

Анализ соотношений  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ ,  $\beta_{11}+\beta_{12}/\alpha 1(I)+\alpha 2(I)$  и относительного содержания коллагена типа III в солюбилизированной фракции коллагена нормальной кожи, келоидных и гипертрофических рубцов

Ткань	$\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$	$\beta_{11}+\beta_{12}/\alpha 1(I)+\alpha 2(I)$	$\alpha 1(III) \times 100 / \alpha 1(I)+\alpha 2(I)$
Нормальная кожа (n=4)	2,0 $\pm$ 0,2a	0,5 $\pm$ 0,1в	19,4 $\pm$ 3,8д
Гипертрофические рубцы (n=11)	4,6 $\pm$ 2,4б	1,1 $\pm$ 0,9г	14,4 $\pm$ 3,7е
Келоидные рубцы (n=12)	4,5 $\pm$ 2,9б	0,9 $\pm$ 0,5г	14,65,8е

Результаты представлены как  $M \pm a$ . В скобках указано число образцов, полученных от разных больных. а, б  $p < 0,05$ ; в, г  $p > 0,05$ ; д, е  $p > 0,05$

**Результаты и обсуждение.** Как видно из таблицы 1, средние значения величин отношений мономеров  $[\alpha 1(I)/\alpha 2(I)]$ , димеров и мономеров  $[\beta_{11}+\beta_{12}/\alpha 1(I)+\alpha 2(I)]$  коллагена типа I в ткани келоидных рубцов, так же как и в ткани гипертрофических рубцов в основном выше, чем соответствующие средние показатели в нормальной коже. Относительное содержание коллагена типа III в рубцовой ткани в среднем ниже, чем в коже. Следует отметить, что все эти показатели варьировали у разных больных в широких пределах и представлялось важным выяснить причину таких колебаний. Был проведен анализ зависимости исследованных величин от давности гипертрофических и келоидных рубцов, который показал, что величина отношения  $\beta_{11}+\beta_{12}/\alpha 1(I)+\alpha 2(I)$  коллагена типа I гипертрофических рубцов изменяется с возрастом рубца. Тип зависимости определен как гиперболическая функция вида  $y=a+bx+c/x$  (Рис. 1А). Ткань более молодых гипертрофических рубцов характеризуется повышенной величиной отношения  $\beta_{11}+\beta_{12}/\alpha 1(I)+\alpha 2(I)$ , которая уменьшается по мере старения рубца, приближаясь к величине, характерной для нормальной кожи. Это отношение не изменяется с возрастом келоидного рубца (Рис. 1Б).

Величина отношения  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  снижается с возрастом гипертрофического рубца, следуя той же зависимости, от приблизительно 10 в молодых рубцах до 2 в старых (Рис. 2А). Полученные данные показывают, что молодые гипертрофические рубцы содержат большее количество гомотримеров коллагена типа I, чем старые. Для ткани келоидных рубцов не удалось выявить возрастной закономерности изменения отноше-

ния  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  коллагена типа I и эти величины достоверно не различались для молодых и старых рубцов (Рис.2Б).

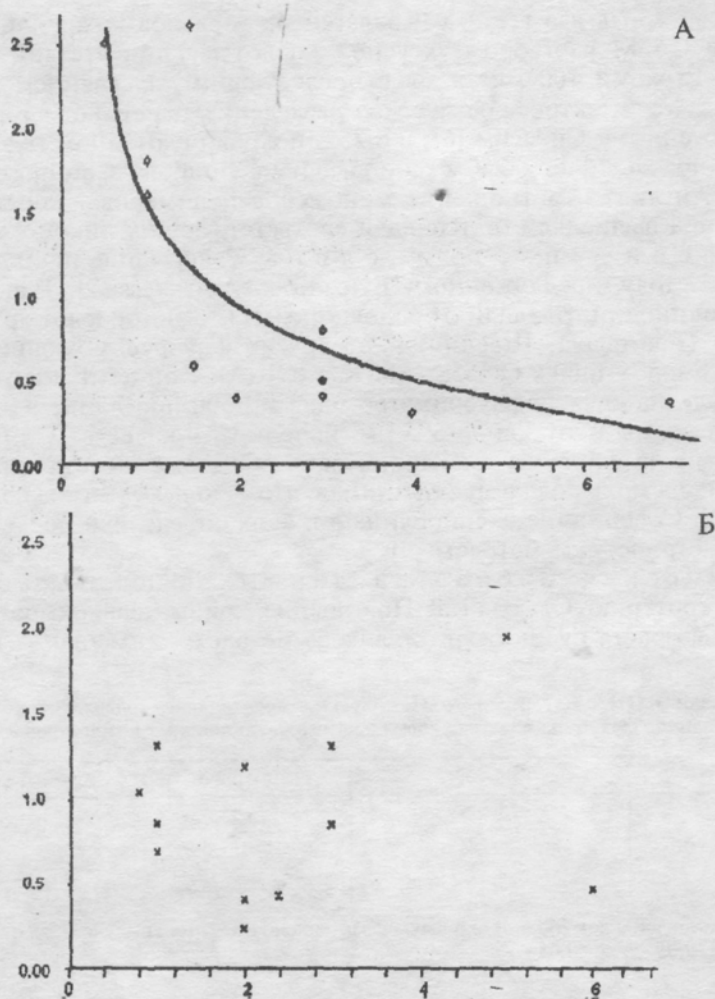


Рисунок 1. Зависимость величины отношения  $\beta$  и  $\alpha$  цепей коллагена типа I от возраста рубца.

По оси абсцисс — возраст рубца (годы)

По оси ординат —  $\beta_{11} + \beta_{12}/[\alpha 1(I) + \alpha 2(I)]$

А — гипертрофический рубец,  $y=0,570-0,080x+1,085/x$

Б — келоидный рубец

Сравнение гипертрофических и келоидных рубцов показало, что молодые (0.5-1 год) гипертрофические рубцы характеризуются более высокими отношениями  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  —  $7,5 \pm 2,3$  и  $3,3 \pm 0,8$  ( $p < 0,05$ ) и  $\beta_{11} + \beta_{12}/\alpha 1(I) + \alpha 2(I)$  —  $2,0 \pm 0,5$  и  $1,0 \pm 0,3$  ( $p < 0,05$ ). Однако величина отношения димеров и мономеров в более старых (3-7 лет) келоидных рубцах была выше, чем в гипертрофических рубцах того же возраста ( $1,1 \pm 0,6$  и  $0,5 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ).

Определение процентного соотношения  $\alpha 1(III)/\alpha 1(I) + \alpha 2(I)$  коллагеновых цепей показало, что относительное содержание коллагена типа III в гипертрофических рубцах в диапазоне исследуемых возрастов не изменяется и составляет  $17,0 \pm 7,0$ . В молодых келоидных рубцах ( $1,1 \pm 0,3$  года) относительное содержание коллагена типа III было обнаружено равным  $13,0 \pm 3,0$ , а в более старых ( $3,2 \pm 1,5$  года) —  $20,0 \pm 9,0$ . Однако выявленные различия оказались статистически не достоверными.

Результаты определения зрелых сшивок со структурой пирилинолина в рубцовой ткани представлены в таблице 2. Как видно из этих данных, содержание пиридинолина в келоидной ткани в два раза превышает содержание его в ткани гипертрофических



рубцов ( $p < 0,05$ ). Нормальная кожа практически не содержит пиридиновых сшивок. Однако, различия между гипертрофическими и келоидными рубцами, отмеченные для различных возрастов, дают основание предполагать, что содержание пиридинов может зависеть не только от типа рубца, но и от его возраста.

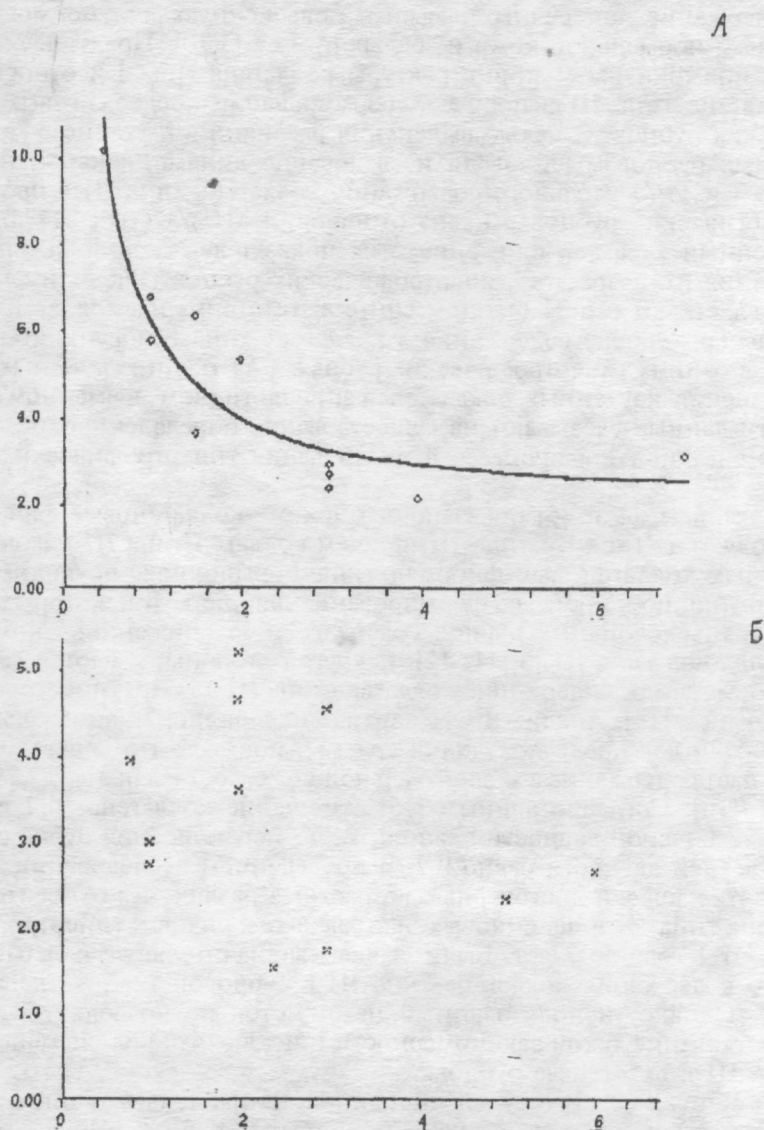


Рисунок 2. Зависимость отношений  $\alpha$ -цепей в коллагене типа I от возраста рубца.

По оси абсцисс — возраст рубца (годы)

По оси ординат —  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$

А — гипертрофический рубец,  $y = 1,842 - 0,00006x + 4,267/x$

Б — келоидный рубец

Таблица 2

Содержание сшивок со структурой пиридилина в образцах ткани

	Гипертрофический рубец (n=6)	Келоидный рубец (n=6)	Нормальная кожа (n=4)
Пиридинолин (моль/моль коллагена)	$0,069 \pm 0,036$	$0,116 \pm 0,044$	$0,003 \pm 0,001$
Средний возраст рубцов (годы)	$3,5 \pm 2,2$	$2,9 \pm 2,2$	

Результаты представлены как  $M \pm \alpha$ . В скобках дано количество проанализированных образцов. Различия значений между келоидными и гипертрофическими рубцами статистически достоверно ( $p < 0,05$ ).

Имеющиеся в литературе данные позволяют предполагать существование как различных, так и общих биологических факторов, ответственных за формирование келоидных и гипертрофических рубцов, причем эти факторы могут перекрываться и усиливать друг друга. Было обнаружено, что фибриллярный коллаген келоидной ткани имеет сниженное содержание поперечных связей и повышенную растворимость по сравнению с коллагеном нормальной кожи и зрелых рубцов [3,10]. Практически отсутствуют исследования динамики изменения структуры коллагена типа I и относительного содержания коллагена типа III в процессе формирования послеожоговых келоидных и гипертрофических рубцов. С целью выяснения различий в патогенезе гипертрофических и келоидных рубцов мы провели исследование динамики изменения структуры коллагена типа I и относительного содержания коллагена типа III в процессе формирования патологических рубцов. Анализ отношений  $a1(I)/a2(I)$  и  $b11+b12/a1(I)+a2(I)$  выявил нелинейный характер снижения этих показателей и приближение их к нормальным значениям с возрастом гипертрофических рубцов (Рис. 1 и 2). Полученные данные свидетельствуют о повышенном синтезе гомотримеров коллагена типа I и относительно высоком уровне содержания в коллагене типа I дифункциональных поперечных связей в ранних гипертрофических рубцах. Для ткани келоидных рубцов такая динамика изменения изученных показателей в аналогичном временном диапазоне не характерна. Эти данные указывают на существование определенных различий в метаболизме коллагена типа I в процессе формирования гипертрофических и келоидных рубцов.

В работе Fleishmajer et al. [5] показано, что в коже коллагеновые фибриллы состоят из гибридов коллагена типа I и типа III, причем коллаген типа III находится на периферии интактных коллагеновых фибрилл типа I, выполняя, по-видимому, важную регуляторную функцию в процессе формирования фибрилл. В некоторых работах установлено, что ткань келоидных рубцов содержит либо сниженное, либо нормальное количество коллагена типа III [3, 11, 12]. С другой стороны, имеются данные, демонстрирующие повышенное содержание коллагена типа III в ткани гипертрофических [13] и келоидных рубцов [14]. Анализ BrCN пептидов келоидной ткани больных, исследованной спустя 5-20 лет после получения травмы, показал, что содержание коллагена III типа превышает содержание его в нормальной коже, составляя  $31,6 \pm 2,2\%$  и  $21,4 \pm 2,7\%$  соответственно [10]. Согласно данным [15] отношение коллагена III/I в гипертрофических рубцах 22-дневной давности равно 0,72, по мере старения рубца оно снижается и в рубцах 40-летней давности равно 0,2. В проведенном исследовании нами не были обнаружены статистически достоверные возрастные различия в относительном содержании коллагена типа III в пепсиновых экстрактах келоидов и гипертрофических рубцов в возрасте от 1 года до 7 лет. Были выявлены значительные колебания величины относительного содержания коллагена типа III в рубцовой ткани отдельных больных (от 7 до 26%). Однако, использованный нами метод не позволяет с уверенностью отрицать существование такой закономерности и исключить роль изменения в синтезе коллагена типа III в патогенезе рубцов.

Поперечная сшивка со структурой пиридинолина найдена в ткани гипертрофических и келоидных рубцов, но не в ткани нормальных рубцов [4]. Проведенное нами исследование выявило еще одно различие между гипертрофическими и келоидными рубцами в отношении среднего содержания пиридинолина, выраженного в молях поперечной сшивки на моль коллагена. Было обнаружено, что содержание пиридинолина в келоидах приблизительно в 2 раза выше, по сравнению с гипертрофическими рубцами.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что молодые келоидные рубцы, по сравнению с гипертрофическими рубцами того же возраста, имеют сниженный уровень содержания дифункциональных сшивок и гомотримеров коллагена типа I, повышенное содержание трифункциональных сшивок со структурой пиридинолина. Эти данные подтверждают предположение о том, что в развитии келоидов и гипертрофических рубцов имеются как общие, так и различные нарушения метаболизма коллагена.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Babu M., Diegelman R., Oliver N. // Mol. Cell. Biochem. - 1989. - Vol. 9. — P. 1642-1650.
- 2 Rockwell W.B., Cohen I.K., Ehrlich H.P. // Plastic and Reconstructive surgery. — 1989. — Vol. 84. — P. 827-837.

- 3 Knapp T.R., Daniels J.R., Kaplan E.N. // *Am. J. Pathol.* — 1977. — Vol. 86. — P. 47-63.
- 4 Moriguchi T., Fujimoto D. // *J. Invest. Dermatol.* — 1979. — Vol. 72. — P. 143-145.
- 5 Fleishmajer R., MacDonald E.D., Perlsh J.S., Burgeson R.E., Fisher L.W. // *Journal of Structure Biology.* — 1990 — Vol. 105. — P.1-8.
- 6 Sykes B., Puddle B., Francis M., Smith R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1976. — Vol. 72. — P. 1472-1480.
- 7 Eyre D.R., Koob T.J., Van Ness K.P. // *Analytical biochemistry.* — 1984. — Vol. 137. — P. 380-388.
- 8 Robins S. P. // *Biochemical Journal.* — 1983. — Vol. 215. — P. 167-173.
- 9 Bergman I., Loxley R. // *Analytical chemistry.* — 1963. — Vol. 35. - P. 1961-1965.
- 10 DiCesare P.E., Cheung D.T., Perelman N., Libaw E., Peng L., Nimni M.E. // *Matrix.* — 1990. — Vol. 10. — P. 172-178.
- 11 Abergel R.P., Pizzurro D., Meeker C.A., Lask G., Matsuoka L.Y., Minor R.R., Ciu M.-T., Uitto J. // *J. Invest. Dermatol.* — 1985. — Vol. 84. — P. 384-390.
- 12 Clore J.N., Cohen I.K., Diegelmann R.F. // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1979. — Vol. 586. — P. 384-390.
- 13 Bailey A.J., Bazin S., Sims T.J., Le Lous M., Nicoletis C., Delaunay A. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1975. — Vol.405. — P. 412-421.
- 14 Weber L., Miegel W.N., Spier W. // *Arch. Derm. Res.* — 1978. — Vol. 261. — P. 63-71.
- 15 Hayakawa T., Hashimoto Y., Myokei Y., Aogama H., Izawa Y. // *Clinica Chimica Acta.* — 1979. — Vol. 93. — P. 119-125.

#### COMPARATIVE STUDY OF COLLAGEN IN HYPERTROPHIC AND KELOID SCARS

*O.V.Podobed, N.N.Prozorovskaya, E.A.Kozlov, T.A.Tsvetkova, C.I.Vozdvidzensky, A.A.Delvig*

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow.  
Institute of Pediatrics and Child Surgery, Moscow.

The relative percentage of type III to type I collagen, the ratio of  $\alpha 1(I)$  to  $\alpha 2(I)$  collagen chains and the ratio of dimers ( $\beta$ -chains) to monomers ( $\alpha$ -chains) in type I collagen have been measured in solubilized collagen fractions from keloids and hypertrophic scars aged about 1-7 years after burn. In tissue samples the content of crosslink with structure of pyridinoline were analyzed and expressed as mole of crosslink per mole of collagen. A comparison between hypertrophic and keloid scars has shown that the young (about 1 year) hypertrophic scars have higher ratios  $\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$  and  $\beta_{11}+\beta_{12}/\alpha 1(I)+\alpha 2(I)$ . The increased proportion of  $\beta$ -chains in the younger hypertrophic scars approximated to the same level as in normal skin within 7 years after lesion. There was no decrease in the ratio dimers/monomers of collagen type I with age of keloid scar tissue. The relative amount of collagen type III in young keloid scars was found decreased as compared to age-matched hypertrophic scars ( $13\pm 3$  and  $17\pm 7$  respectively), but was similar in the older scars. The average pyridinoline crosslinks content per mole of collagen in keloids was 2 times as high as in hypertrophic scars. The data support the suggestion that general, as well as peculiar disturbances of collagen metabolism are involved in the development of keloids and hypertrophic scars.