# КОЛЛАГЕНЫ І И ІІ ТИПОВ В ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Жураковский И.П.<sup>1,2</sup>, Архипов С.А.<sup>1</sup>, Архипова В.В.<sup>1</sup>, Карпухина К.В.<sup>2</sup>, Давлетова К.И.<sup>1</sup>, Аутеншлюс А.И.<sup>1,2</sup>

 $^{1}$ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, е-mail: murash2003@yandex.ru;

 $^2$ ФГБНУ «Институт молекулярной биологии и биофизики — отделение ФИЦ ФТМ», Новосибирск, НИИ МББ

Материалы и методы. Проведен морфометрический анализ операционного материала 39 пациентов в возрасте 59 лет (55,0; 66,8) с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, а также 11 пациентов с фиброаденомой молочной железы в возрасте 48 лет (28,0; 56,8). Были изучены тинкториальные свойства коллагеновых волокон с помощью анализа RGB-модели микрофотографий срезов биоптатов, окрашенных пикрофуксином, а также относительная площадь и интенсивность окрашивания коллагенов I и II типов, выявленных иммуногистохимическим методом. Полученные результаты. Анализ RGB-модели микрофотографий срезов биоптатов позволил установить достоверное увеличение красной и особенно зеленой составляющей, что характеризовало смещение окрашивания коллагеновых волокон в группе пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в оранжевую часть видимого спектра, что являлось индикатором изменения тинкториальных свойств ткани. Эти изменения физико-химических свойств коллагеновых волокон связаны не только с их деградацией, но и с синтезом коллагена другого типа, что подтверждается данными морфометрического анализа, которые характеризовались увеличением относительной площади, занимаемой коллагеном ІІ типа, и интенсивности его окрашивания у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа по сравнению с фиброаденомой молочной железы. Выводы. Выявленные изменения физико-химических свойств коллагеновых волокон могут быть обусловлены не только их деградацией, но и синтезом опухолеассоциированными фибробластами коллагена ІІ типа, выявляемого иммуногистохимическим методом, что свидетельствовало об экспрессии в этих клетках генов, характерных для хрящевой ткани, а, следовательно, приобретении этими клетками черт остеобластического фенотипа. Это позволяет судить об атипизме не только эпителиальных клеток, которое наблюдается при раке молочной железы, но и о появлении отличительных особенностей стромального компонента опухоли при инвазивной карциноме неспецифического типа, что может служить дополнительным диагностическим признаком злокачественности процесса.

Ключевые слова: инвазивная карцинома неспецифического типа, фиброаденома, молочная железа, коллаген I типа, коллаген II типа, морфометрический анализ.

# **COLLAGENS TYPES I AND II IN BREAST TUMORS**

Zhurakovsky IP.<sup>1,2</sup>, Arkhipov S.A.<sup>1</sup>, Arkhipova V.V.<sup>1</sup>, Karpukhina K.V.<sup>2</sup>, Davletova K.I.<sup>1</sup>, Autenshlyus A.I.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FSBEI HE Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health of Russia, Novosibirsk, e-mail: murash2003@yandex.ru;

<sup>2</sup>FSBSI Institute of Molecular Biology and Biophysics - subdivision of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicin, Novosibirsk

Materials and methods. The morphometric analysis of the surgical material of 39 patients aged 59 years (55.0; 66.8) with a diagnosis of invasive breast carcinoma of non-specific type, as well as 11 patients with fibroadenoma of the breast at the age of 48 years (28.0; 56.8) was carried out. The tinctorial properties of collagen fibers were studied by analyzing the RGB-model of microphotographies of sections of biopsy specimens stained with picrofuxin, as well as the relative area and intensity of staining of collagen types I and II, identified by immunohistochemical method. Obtained result. The analysis of RGB-model micro-photographs of sections of biopsy specimens has allowed to establish a significant increase in the red and especially the green component, which characterized the displacement of the staining of collagen fibers in the group of patients with invasive carcinoma of the breast non-specific type in the orange part of the visible spectrum, which was the indicator of changes in tinctorial properties of the fabric. These changes in the physicochemical properties of collagen fibers are associated not only with their degradation but also with the synthesis of collagen of another type, which is confirmed by morphometric analysis, which was characterized by an increase in the relative area occupied by type II collagen and the intensity of its staining in patients with non-specific type of invasive carcinoma in comparison with fibroadenoma of the mammary gland. Conclusion. The revealed changes in the physicochemical properties of collagen fibers can be caused not only by their degradation, but also by the

synthesis of tumor-associated fibroblasts of collagen type II detected by the immunohistochemical method, which indicates the expression in these cells of genes characteristic of cartilaginous tissue and, consequently, the acquisition by these cells traits of the osteoblastic phenotype. This allows us to judge not only the atypism of epithelial cells, which is observed in breast cancer, but also about the appearance of distinctive features of the stromal component of the tumor in invasive carcinoma of a non-specific type, which may serve as an additional diagnostic sign of the malignancy process.

Keywords: invasive carcinoma of non-specific type, fibroadenoma, mammary gland, collagen type I, collagen type II, morphometric analysis.

В составе соединительных тканей организма человека и животных коллагеновые структуры являются наиболее представительными ее компонентами, образующими сложную организацию. Основой коллагеновых структур является фибриллярный белок коллаген, который обуславливает свойства этих структур. В настоящий момент выделяют 28 типов коллагенов, которые различаются строением полипептидной цепи, каждая из которых является продуктом экспрессии индивидуального гена. При этом коллаген I типа распространен в твердых и мягких тканях, является главным белком костей, дермы, сухожилий, а коллаген II типа локализуется преимущественно в гиалиновой хрящевой ткани, стекловидном теле глаза, пульпозном ядре межпозвонкового диска [1].

В научной литературе последних лет отмечается повышенный интерес к реакции экстрацеллюлярного матрикса при опухолевых процессах [2; 3]. При этом отмечается, что коллагены могут непосредственно влиять на пролиферацию и дифференцировку эпителия молочной железы [4], а также указывается, что коллаген I типа действует как физический барьер для миграции клеток и препятствует пролиферативной активности как нормальных, так и раковых клеток [5], а деградация коллагена I типа может играть ключевую роль в приобретении инвазивных характеристик рака молочной железы [6; 7].

Дальнейшее выяснение механизмов, лежащих в основе влияния экстрацеллюлярного матрикса, и в частности коллагенов различных типов, на опухолевую прогрессию, требует детального изучения.

**Цель исследования**: изучить характер распределения коллагенов I и II типов у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа и фиброаденомой молочной железы.

### Материал и методы исследования

Проведено исследование операционного материала 39 пациентов в возрасте 59 лет (55,0; 66,8) с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа (1 группа). Кроме того, был исследован операционный материал 11 пациенток с фиброаденомой молочной железы (2 группа) в возрасте 48 лет (28,0; 56,8).

Операционный материал молочной железы фиксировали в 10%-ном формалине. Из залитых в парафин объектов делали серийные срезы толщиной 7 мкм. Для оценки тинкториальных свойств коллагеновые волокна выявляли пикрофуксином по ван Гизону.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии коллагена II типа проводили на парафиновых срезах опухолей с помощью непрямого ABC-пероксидазного метода с использованием набора «Vectastain Universal Elite ABC Kit» (Vector Laboratories, кат. № PK-7200). Для выявления коллагена II использовали мышиные моноклональные антитела COL2A1 - M2139 в разведении 1:100 с учетом рекомендаций производителя (кат. № sc-52658, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Для выявления коллагена I типа проводили иммуногистохимическое исследование его экспрессии на срезах опухолей с помощью непрямого ABC-пероксидазного метода с использованием набора «Vectastain Universal Elite ABC Kit» (Vector Laboratories, кат. № PK-7200). Для выявления коллагена I использовали мышиные моноклональные антитела COL1A (COL-1) в разведении 1:100 с учетом рекомендаций производителя (кат. № sc-59772, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). В качестве хромогенного субстрата в обоих случаях использовали диаминобензин (раствор готовится ех tempore из компонентов набора ImmPACT DAB (кат. № SK-4105, Vector Laboratories).

Морфометрический анализ проводился для каждого пациента на 8 микрофотографиях площадью 95587 мкм<sup>2</sup>. Анализ относительной площади, занимаемой коллагеном I и II типов, а также интенсивности специфического окрашивания проводился с помощью программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США). Для определения тинкториальных свойств коллагеновых волокон проводился анализ RGB-модели с помощью дополнительного модуля Measure RGB.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета для статистической обработки SPSS v 17.0 for Windows. Для сравнения независимых групп использовали критерий Крускала—Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна-Уитни. Различия между значениями сравниваемых параметров расценивали как статистически значимые при р < 0,05. Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Ме) и интерквартильный размах (Q1; Q3).

Результаты исследования и их обсуждение

У большинства пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа имелись участки со значительным разволокнением пучков коллагеновых волокон, размытостью их контуров, фрагментированностью. У некоторых больных имелись участки с глыбчатым распадом коллагеновых волокон. Практически у всех пациентов данной группы наблюдались множественные обширные участки с изменением физико-химических свойств коллагеновых волокон, проявлявшимся изменением их тинкториальных свойств (рис. 1).

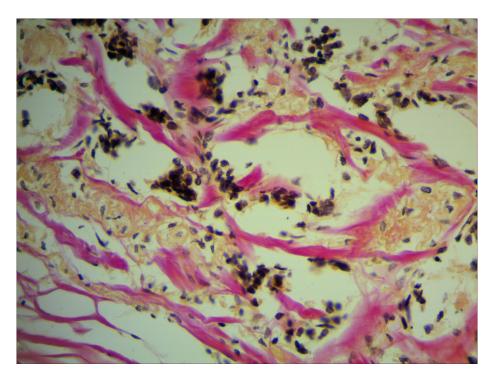


Рис. 1. Изменение тинкториальных свойств коллагеновых волокон с приобретением ими оранжевой окраски у пациента с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа. Окраска пикрофуксином по ван Гизону. Ув. х 400

При морфологическом исследовании препаратов пациентов с фиброаденомой не наблюдалось участков с дегенеративными изменениями коллагеновых волокон, более того, пучки коллагеновых волокон были мощнее и плотно примыкали друг к другу. В отличие от пациентов 1 группы никаких изменений тинкториальных свойств коллагена ни в одном случае не наблюдалось (рис. 2).

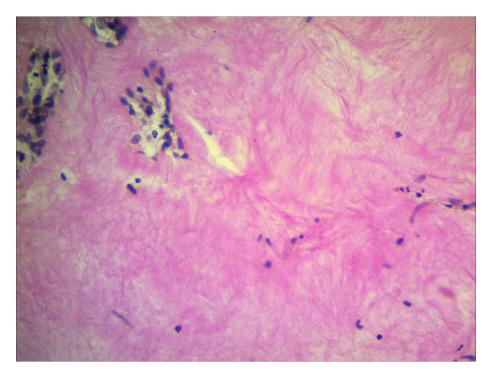


Рис. 2. Сохранение тинкториальных свойств коллагеновых волокон у пациента с фиброаденомой молочной железы. Окраска пикрофуксином по ван Гизону. Ув. х 400

Данные анализа RGB-модели представлены в таблице 1 и характеризуют смещение окрашивания коллагеновых волокон в группе пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в оранжевую часть видимого спектра. Эти изменения, характеризующие изменения физико-химических свойств коллагеновых волокон, могут быть связаны не только с их разрушением, но и с синтезом другого типа коллагена.

Таблица 1 Результаты анализа RGB-модели микрофотографий срезов биоптатов доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы

(значения для каналов представлены в у.е. (Me (Q1; Q3))

Канал / группа	1 группа	2 группа	
red	197,7 (190,3; 205,1)	188,0 (176,1; 191,9)	
	$p_{1-2} = 0.018$		
green	146,5 (129,4; 159,4)	98,4 (85,6; 112,5)	
	$p_{1-2} = 0,0001$		
blue	186,4 (175,0; 194,0)	177,5 (162,7; 186,2)	
	$p_{1-2} = 0.361$		

Иммуногистохимическое исследование показало, что основным типом коллагена в

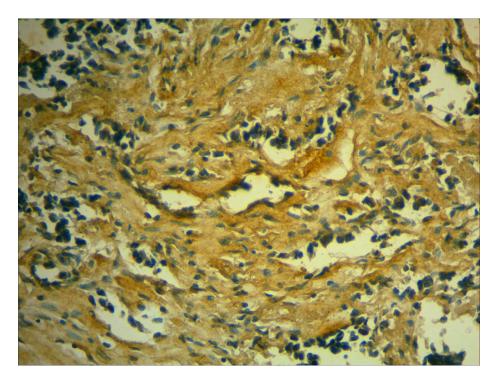


Рис. 3. Коллаген I типа в строме пациента с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа. Иммуногистохимическое выявление коллагена I типа с последующей докраской ядер гематоксилином Майера. Ув. х 400

Для проверки возможности синтеза иного типа коллагена, отличающегося от характерного В неизмененной ткани молочной железы, было проведено иммуногистохимическое исследование биоптатов на содержание коллагена II типа. Как представлено на рисунке 4, часть клеток стромы экспрессировала коллаген II типа, который не свойственен данному типу ткани, в результате чего наблюдалось формирование коллагеновых волокон, имеющих в своей основе иной тип коллагена. Данные морфометрического анализа относительной площади, занимаемой коллагенами I и II типов, и интенсивности специфического окрашивания приведены в таблице 2. Они характеризуют увеличение относительной площади, занимаемой коллагеном II типа, и интенсивности его окрашивания у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа по сравнению с фиброаденомой молочной железы.

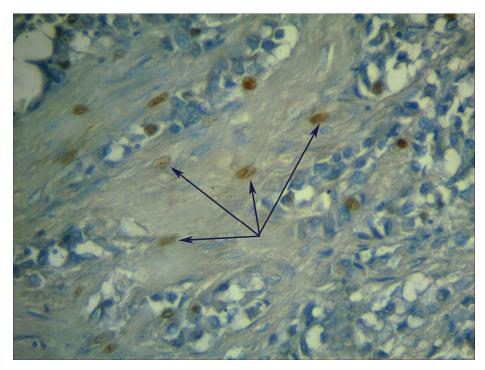


Рис. 4. Экспрессия коллагена II типа в опухолеассоциированных фибробластах пациента с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа. Иммуногистохимическое выявление коллагена II типа с последующей докраской ядер гематоксилином Майера.

Таблица 2 Данные морфометрического анализа относительной площади, занимаемой коллагенами I и II типов, и интенсивности специфического окрашивания (Me (Q1; Q3)

Ув. х 600

Признак / группа	1 группа	2 группа
относительная площадь, занимаемая	28,0 (22,9; 31,4)	31,8 (28,4; 36,9)
коллагеном I типа (в %)	$p_{1-2} = 0.014$	
интенсивность окрашивания коллагена I типа	56,8 (47,3; 64,7)	71,9 (55,6; 84,1)
(в у.е.)	p1-2 = 0.023	
относительная площадь, занимаемая	49,2 (44,1; 55,3)	26,2 (24,0; 30,1)
коллагеном II типа (в %)	p1-2 = 0,00001	
интенсивность окрашивания коллагена II типа	86,7 (81,1; 92,4)	50,8 (43,1; 71,3)
(B y.e.)	p1-2 = 0,00001	

Полученные данные позволяют заключить, что изменения в строме фиброаденомы происходят за счет усиленного синтеза коллагена I типа, что соответствует основному коллагену рыхлой неоформленной соединительной ткани, которая и представлена в молочной железе. При инвазивной карциноме неспецифического типа наблюдается существенная перестройка десмопластической стромы: наряду с очагами разволокнения и

распада коллагеновых волокон присутствуют зоны с наличием клеток мезенхимальной природы, интенсивно экспрессирующих коллаген II типа, не характерного для данного типа ткани. Это позволяет говорить не только об атипизме эпителиальных клеток, который наблюдается при раке молочной железы, но и о появлении отличительных особенностей стромальных компонентов опухоли.

Внеклеточный матрикс все чаще признается важным регулятором рака молочной железы. Матричные белки, которые продуцируются при раке молочной железы, включают фибриллярные коллагены, фибронектин, специфические ламинины и протеогликаны, а также матричные клеточные белки. Многие из белков внеклеточного матрикса играют важную функциональную роль в прогрессировании рака молочной железы и метастазах [8; 9]. Считается, что ассоциированные с раком фибробласты играют существенную роль в прогрессировании, выживании, метастазировании и инвазии рака посредством секреции различных факторов роста, цитокинов и хемокинов и деградации белков внеклеточного матрикса [10; 11], что позволяет рассматривать их как особую клеточную популяцию, отличную от типичных фибробластов.

#### Заключение

Проведенное исследование позволило выявить некоторые особенности строения стромы при злокачественном и доброкачественном опухолевом процессе в молочной железе. Анализ RGB-модели микрофотографий срезов биоптатов позволил установить достоверное увеличение красной и особенно зеленой составляющей, что характеризовало смещение окрашивания коллагеновых волокон в группе пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в оранжевую часть видимого спектра. Данные изменения физико-химических свойств коллагеновых волокон могут быть обусловлены не только их деградацией, но и синтезом опухолеассоциированными фибробластами коллагена ІІ типа, несвойственного рыхлой неоформленной соединительной ткани молочной железы. Учитывая, что часть клеток стромы, наряду с коллагеном І типа, стала секретировать коллаген II типа, имеющий иное строение полипептидной цепи, что свидетельствует об экспрессии в этих клетках генов, характерных для хрящевой ткани, то есть приобретении этими клетками черт остеобластического фенотипа. Это позволяет говорить об атипизме не только эпителиальных клеток, которое наблюдается при раке молочной железы, но и о появлении отличительных особенностей стромального компонента опухоли при инвазивной карциноме неспецифического типа, что может служить дополнительным диагностическим признаком злокачественности процесса.

# Список литературы

- 1. Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия): в 2 т. Т. 1 / под ред. С. П. Миронова. М.: Известия, 2009. 380 с.
- 2. Calvo A., Catena R., Noble M.S., Carbott D., Gil-Bazo I., Gonzalez-Moreno O., Huh J.I., Sharp R., Qiu T.H., Anver M.R., Merlino G., Dickson R.B., Johnson M.D., Green J.E. Identification of VEGF-regulated genes associated with increased lung metastatic potential: functional involvement of tenascin-C in tumor growth and lung metastasis. Oncogene. 2008. Vol. 27. P. 5373-5384.
- 3. Ma X.J., Dahiya S., Richardson E., Erlander M., Sgroi D.C. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. Breast Cancer Res. 2009. Vol. 11, N.1. P. R7.
- 4. Lin C.Q., Bissell M.J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J. 1993. Vol. 7. p. 737-743.
- 5. Sodek K.L., Brown T.J., Ringuette M.J. Collagen I but not Matrigel matrices provide an MMP-dependent barrier to ovarian cancer cell penetration. BMC Cancer. 2008. Vol. 8. p. 223.
- 6. Duffy M.J., Maguire T.M., Hill A., McDermott E., O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. Breast Cancer Res. 2000. Vol. 2. P. 252-257.
- 7. Kim S., Choi J.H., Lim H.I., Lee S.K., Kim W.W., Cho S., Kim J.S., Kim J.H., Choe J.H., Nam S.J., Lee J.E., Yang J.H. EGF-induced MMP-9 expression is mediated by the JAK3/ERK pathway, but not by the JAK3/STAT-3 pathway in a SKBR3 breast cancer cell line. Cell Signal. 2009. Vol. 21. P. 892-898.
- 8. Choi S.K., Kim H.S., Jin T., Moon W.K. LOXL4 knockdown enhances tumor growth and lung metastasis through collagen-dependent extracellular matrix changes in triple-negative breast cancer. Oncotarget.- 2017. Vol. 8, N 7. P. 11977-11989.
- 9. Kaushik S., Pickup M.W., Weaver V.M. From transformation to metastasis: deconstructing the extracellular matrix in breast cancer. Cancer Metastasis Rev. 2016. Vol. 35, N. 4. P. 655-667.
- 10. Yamamura Y., Asai N., Enomoto A., Kato T., Mii S., Kondo Y., Ushida K., Niimi K., Tsunoda N., Nagino M., Ichihara S., Furukawa K., Maeda K., Murohara T., Takahashi M. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression // Cancer Res. 2015. Vol. 75. P. 813-823.
- 11. Buchsbaum, R.J. and Oh S.Y. Breast cancer-associated fibroblasts: where we are and where we need to go. Cancers (Basel). 2016. Vol. 8, N 2. pii E19.