

Л.А. Налескіна
Н.Ю. Лук'янова
Т.В. Задворний
Л.М. Кунська
В.Ф. Чехун

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: інвазивний
протоковий рак молочної залози,
архітектоніка колагенових
волокон, паренхіматозно-
стромальне співвідношення,
десмопластичні зміни.

ОСОБЛИВОСТІ АРХІТЕКТОНІКИ КОЛАГЕНОВИХ СТРУКТУР У ПУХЛИНАХ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ З РІЗНИМИ ПРОЯВАМИ РЕМОДЕЛЮВАННЯ СТРОМАЛЬНОГО КОМПОНЕНТУ

В останні роки існує думка, що десмопластично змінена сполучна тканина стромального компонента новоутворення є найбільш вагомим рушійною силою пухлинної прогресії у хворих на рак молочної залози (РМЗ) завдяки колагену I типу, з накопиченням якого пов'язують метастазування пухлинних клітин та несприятливий перебіг захворювання. **Мета:** визначити деякі особливості архітектоніки колагенових структур у новоутвореннях інвазивного протокового РМЗ з різним співвідношенням епітеліального та стромального компонентів та встановити асоціативні зв'язки між отриманими результатами та клініко-патологічними характеристиками хворих. **Об'єкт і методи:** проаналізовано гістологічні препарати 69 хворих на РМЗ, забарвлені пікрофуксином за методом Ван Гізон. Отримані результати зіставлені з клініко-патологічними характеристиками пацієнтів. **Результати:** показано, що найбільш виражені перебудови архітектоніки волокнистих структур, а саме колагенових волокон, відбуваються у групі новоутворень із переважанням десмопластично зміненої сполучної тканини: збільшення маси колагенових структур, щільності їх розташування, зростання ширини прошарків, вирівнювання, прямолінійна спрямованість, подовження волокнистих структур. Зіставлення отриманих даних у виділених групах пухлин хворих на РМЗ із клініко-патологічними особливостями перебігу захворювання виявило ряд закономірностей, які певним чином асоціюються з проліферативним потенціалом новоутворень, їх рецепторним статусом, молекулярним підтипом, віком хворих, стадією захворювання та наявністю регіонарних метастазів. **Висновок:** результати морфологічних та клініко-патологічних зіставлень на матеріалі хворих на інвазивний протоковий РМЗ свідчать, що перебіг пухлинного процесу залежить не лише від стану епітеліального компонента новоутворення, але і значною мірою від особливостей сполучної тканини, зокрема при її десмопластичній перебудові та зміні архітектоніки колагенових волокон.

На сьогодні багатьма фахівцями в експериментах *in vitro* та *in vivo*, а також на клінічному матеріалі проведено численні дослідження, які спрямовані на встановлення значення строми пухлини, її мікрооточення, а також їх взаємозв'язку з паренхіматозним компонентом первинного осередку в прогресії пухлинного росту внаслідок формування метастатичного фенотипу. Як відомо, часто мікрооточення у солідних пухлинах займає більшу частину загальної маси і всі компоненти новоутворень значно відрізняються від таких у нормальних органах. За сучасними уявленнями, стромальне мікрооточення — це комплекс, до складу якого входять непухлинні клітини (у тому числі фібробласти, міофібробласти), позаклітинні молекули (молеку-

ли адгезії, фактори росту, гормони та ін.) та позаклітинний матрикс (елементи сполучної тканини, включаючи колагенові, еластичні, аргірофільні волокна та нерви) [1]. Основними компонентами позаклітинного матриксу вважаються колагени, яких існує 28 різновидів [2].

За даними літератури, проявом реакції сполучної тканини на розвиток епітеліальної пухлини є фіброз із підвищенням її жорсткості, тобто десмоплазія, яка пов'язана із щільною продукцією та відкладенням молекул позаклітинного матриксу, зокрема фібрилярного колагену I типу [3]. Останнім часом у багатьох дослідженнях показано, що особливий внесок у процес фіброзних змін у стромальному компоненті злоякісної пухлини і ремо-

делювання екстрацелюлярного матриксу, належить пухлиноасоційованим фібробластам (ПАФ), зростання кількості яких вважається фактором, що найбільшою мірою зумовлює пухлинну прогресію [4, 5]. Важливим кроком у розвитку десмоплазії є підвищена експресія колагенів, які походять з фібробластів строми, зокрема ПАФ [6].

Мета дослідження полягала у визначенні деяких особливостей стромального компоненту, зокрема архітекtonіки колагенових структур, у пухлинах хворих на інвазивний протоковий РМЗ без особливих специфічних ознак з урахуванням паренхіматозно-стромального співвідношення у новоутворенні і просторової організації пухлинних клітин та зіставленні отриманих даних з клініко-патологічними характеристиками.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізовано гістологічні препарати 69 хворих на інвазивний протоковий РМЗ I–II стадії пухлинного процесу. Вік пацієнток 39–82 роки. Усі хворі на РМЗ дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях. Окрім класичного забарвлення зрізів пухлинної тканини гематоксиліном та еозином [7], для загального уявлення про особливості росту та структури новоутворень, досліджувані зразки було забарвлено пікрофуксином за методом Ван Гізон [8], що дає можливість скласти візуальне мікроскопічне враження про стан колагену в сполучнотканинних волокнах. Згідно з попередніми власними даними, отриманими на підставі морфологічного дослідження пухлин хворих на РМЗ, забарвлених гематоксиліном та еозином, щодо співвідношення паренхіматозного та стромального компонентів [9], усі новоутворення умовно розподілено на 3 групи: 1) переважання у пухлинах клітинних структур над сполучною тканиною (27 спостережень); 2) переважання стромального компоненту (22 спостереження); 3) приблизно рівноцінне співвідношення обох компонентів (20 спостережень). На цьому матеріалі було проведено зіставлення просторової організації пухлин з клініко-патологічними характеристиками, молекулярними підтипами та молекулярним профілем за такими маркерами, як рецептори естрогену та прогестерону, Ki-67 для з'ясування впливу співвідношення паренхіматозно-стромального компоненту на агресивність пухлинного процесу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При морфологічному дослідженні препаратів, забарвлених гематоксиліном і еозином, встановлено, що у пухлинах хворих відмічали 5 варіантів просторових клітинних структур: солідні, тубулярні, альвеолярні, трабекулярні та дискретні у вигляді скупчення або окремих клітин. Проте у новоутвореннях вони були наявні у різних співвідношеннях. У значній кількості пухлин I-ї групи спостерігали-

ся всі просторові клітинні структури, в інших 2 групах — 2–3 варіанти.

Аналіз даних мікроскопічного дослідження гістологічних препаратів хворих на РМЗ, забарвлених за методом Ван Гізона, показав, що в новоутвореннях I-ї групи, де основу пухлини становили клітинні структури, сполучна тканина відігравала роль перетинок, які розділяли між собою невеликі гнізда, а також різні за величиною осередки або значні ділянки пухлинних клітин. Ширина перетинок у різних новоутвореннях цієї групи відрізнялася. Зокрема, при розмежуванні великих солідних щільно розташованих угруповань клітин вони мали вигляд тонких звивистих волокнистих колагенових структур, при розділенні інших просторових структур характеризувалися значно ширшими стрічкоподібними звивистими або певною мірою випрямленими компактно розташованими колагеновими волокнами (рис. 1а та рис. 1б). Слід зазначити, що ознаки випрямлення та подовження колагенових волокон були більш вираженими за наявності у пухлині клітин з тубулярною просторовою організацією (рис. 1в).

Відмінною рисою 2-ї групи досліджених пухлин хворих на РМЗ, для яких притаманне значне збільшення кількості стромального компоненту з десмоплазією сполучної тканини, була зміна архітекtonіки пікрин-позитивних колагенових структур. У різних пухлинах ремоделювання сполучної тканини мало суттєві відмінності. Проявом цього були наступні зміни: збільшення маси колагенових структур та щільності їх розташування, зростання ширини в десмопластично змінених прошарках, вирівнювання та прямолінійність волокнистих структур з їх подовженням, а також зміна ступеня забарвлення у бік послаблення (рис. 2а–д). Наявні у паренхіматозному компоненті новоутворень цієї групи пухлинні клітини часто мали вигляд «замурованих» або стиснутих у великих масивах ущільненої десмопластично зміненої колаген-позитивної сполучної тканини (рис. 2е).

Існують повідомлення про те, що для об'єктивізації візуальних уявлень про організацію, ремоделювання стромального фібрилярного колагену в експериментах *in vitro*, *in vivo*, а також *ex vivo* у пухлинах різного гістогенезу використовують ряд методичних підходів, у тому числі кількісну оцінку, що узагальнено в оглядах літератури останніх років [10]. Зокрема, це застосування поляризованої, конфокальної мікроскопії, які дозволяють встановити кількість волокон, їх довжину, вирівнювання, прямолінійність та ширину [11]. Крім того, це технологія лазерної скануючої мікроскопії, яка базується на інтенсивному лазерному імпульсі, а також двофотонна та багатифотонна лазерна скануюча мікроскопія. Також може використовуватися метод оптичної когерентної еластографії-томографії [12]. Показано, що пухлини РМЗ з вирівняною строною краще реагують на неoad'ювантну

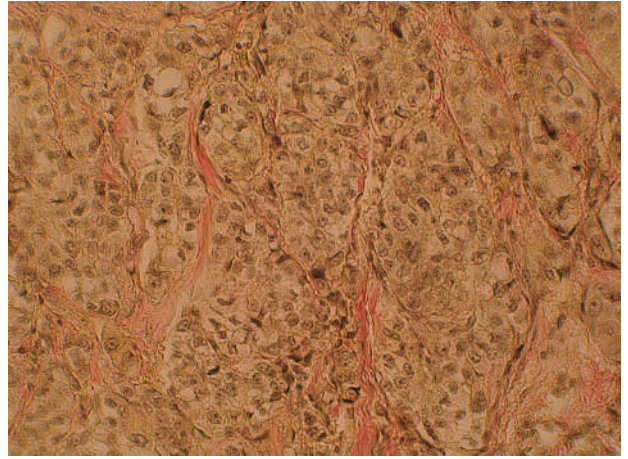
терапію порівняно з дезорганізованою строною, проте у таких хворих частіше виявляють метастази в регіонарні лімфовузли [13]. Зазначене є підтвердженням гіпотези, що пухлинні клітини частіше мігрують при вирівнюванні колагенових волокон. Крім того, дані літератури свідчать про те, що розвиток десмоплазії відбувається в декілька етапів і полягає у зшиванні колагенів, подовженні волокон, їх перебудові з випрямленням, і це пов'язують зі зниженням виживаності хворих із солідними новоутвореннями [14].

Вважається, що розвиток десмопластичного тканинного компоненту, який активно синтезується та ремодельовується популяцією стромальних клітин, є виразною особливістю РМЗ [15]. Слід зазначити, що згідно з даними деяких дослідників, явище десмоплазії сполучної тканини у злоякісних пухлинах у тандемі зі зміною архітекtonіки колагенових волокон та збільшенням маси колагену, пов'язаним зі зростанням кількості ПАФ, асоціюється з інвазією, метастазуванням і, зрештою, з несприятливим прогнозом захворювання та низькою виживаністю хворих з багатьма формами раку, у тому числі РМЗ [16].

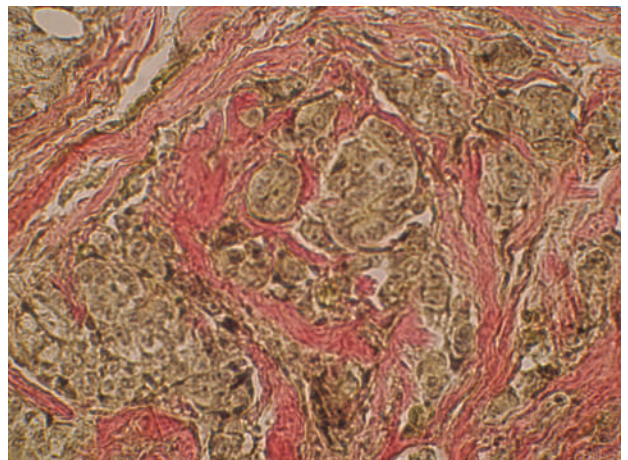
На власному матеріалі у 3-й групі пухлин з відносно рівноцінним співвідношенням паренхіматозного та стромального компонентів ми спостерігали поєднання ознак, характерних для сполучної тканини пухлин 1-ї групи, та тих параметрів, які були визначені під час дослідження сполучної тканини пухлин 2-ї групи і відрізнялися різним ступенем прояву змін у колагенових волокнах.

Зіставлення зазначених вище деталей архітекtonіки колагенових структур, що були притаманні пухлинам з різними співвідношеннями паренхіматозно-стромальних компонентів з клініко-патологічними характеристиками хворих на інвазивний протоковий РМЗ виявило ряд особливостей. Пухлини 1-ї групи, у яких сполучнотканинні перетинки були тонкими та звивистими і розділяли великі осередки пухлинних клітин, в основному спостерігалися у жінок більш молодого віку — 45–60 років (62,0%), з I стадією пухлинного процесу (49,1%), відсутністю метастазів у регіонарні лімфатичні вузли (43,0%), люмінального А молекулярного підтипу (37,4%) з позитивною експресією рецепторів естрогену (46,7%) та низькою експресією Ki-67 (58,4%).

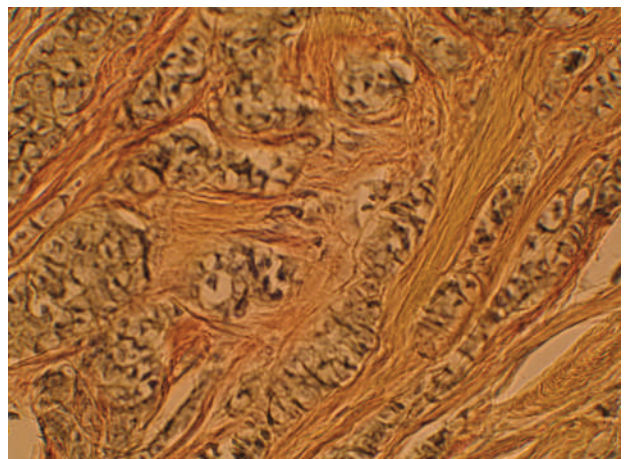
Якщо у новоутвореннях переважала десмопластично змінена сполучна тканина і колагенові волокна відрізнялися значною шириною, були подовженими та мали тенденцію до вирівнювання (2-га група пухлин), такі характеристики архітекtonіки сполучної тканини часто (79,6%) асоціювалися з наступними клініко-патологічними показниками хворих на РМЗ: жінки менопаузального віку (здебільшого старше 60 років), II стадія пухлинного процесу, люмінальний В або базальний молекулярні підтипи, часто метастази у регіонарні лімфатичні вузли, високі значення проліфератив-



а



б



в

Рис. 1. Особливості сполучнотканинного компоненту у новоутвореннях хворих на РМЗ із переважанням паренхіматозного компоненту: а — великі солідні осередки пухлинних клітин розмежовані тонкими різної довжини та звивистості перетинками сполучної тканини; б — різні за величиною солідні угруповання пухлинних клітин розділяють широкі стрічкоподібні звивисті або дещо випрямлені колагенові волокна; в — у новоутвореннях із наявністю у паренхіматозному компоненті трабекулярних просторових структур колагенові волокна мають більш виражені ознаки випрямлення та подовження (забарвлення пікрофуксином за Ван Гізеном, $\times 400$)

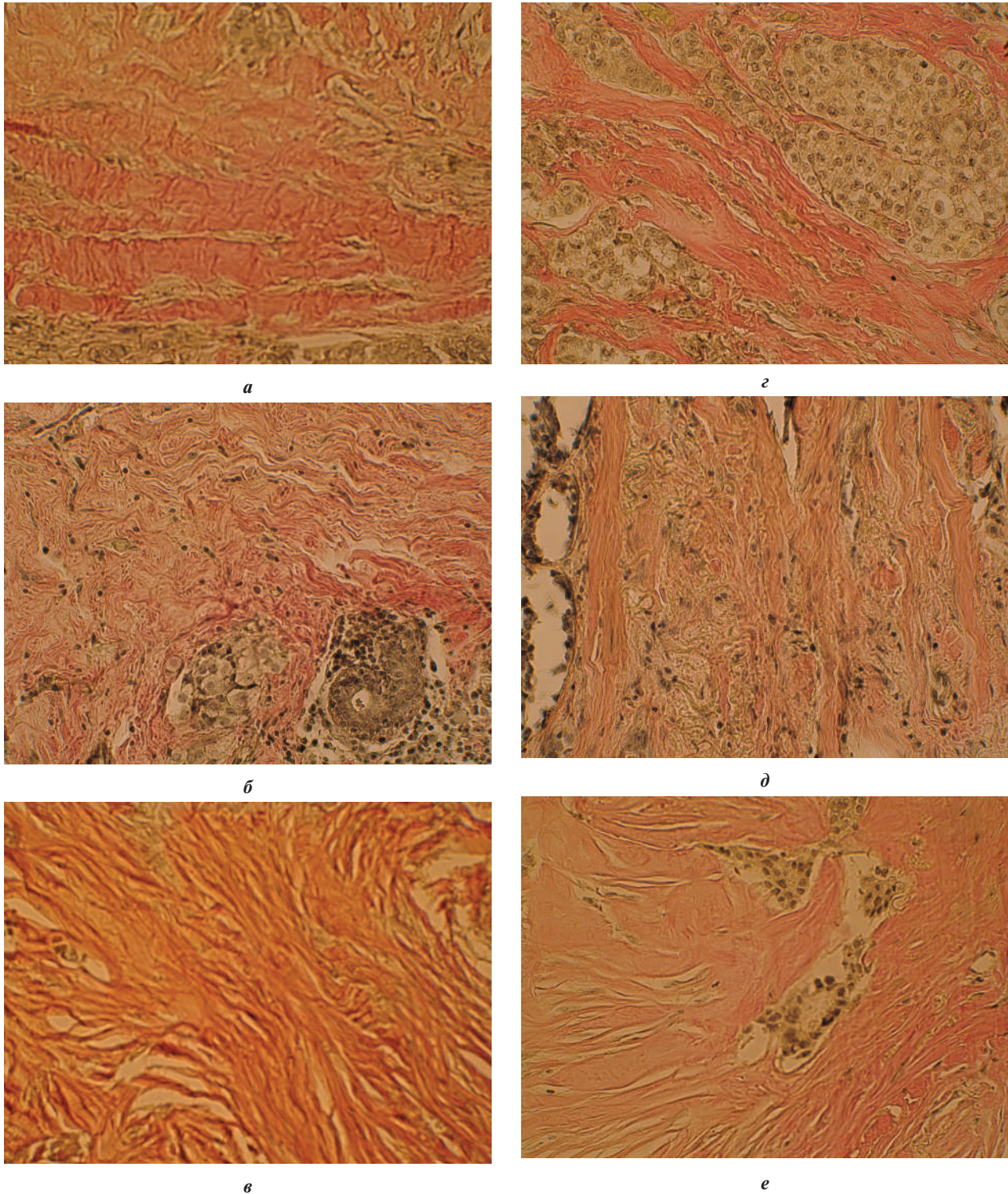


Рис. 2. Ремодельовання сполучної тканини у новоутвореннях хворих на РМЗ із переважанням стромального компоненту: *а* — ділянки зі значними відкладеннями ущільненого колагену у фібрилярних структурах; *б* — збільшення загальної маси десмопластично змінених волокнистих структур у пухлині та щільності їх розташування; *в* — визначається зростання ширини прошарків колагенових структур; *г* — вирівнювання колагенових структур сполучної тканини; *д* — прямолінійність колагенових волокон з їх подовженням; *е* — окремі паренхіматозні структури «замуровані» у великому масиві десмопластично зміненої сполучної тканини (забарвлення пікрофуксином за Ван Гізоном, $\times 400$)

ної активності за маркером Ki-67. Тобто, напрямок асоціативних зв'язків між характеристиками десмопластично зміненого стромального компоненту у хворих на РМЗ 2-ї групи з клініко-патологічни-

ми особливостями пухлинного процесу не суперечить даним, що наводяться в літературі.

У 3-й групі пухлин хворих на РМЗ, у яких виявляли поєднання епітеліальних структур та спо-

лучної тканини (50:50), чітко окресленого зв'язку між архітектонікою колагенових структур у новоутвореннях та клініко-патологічними характеристиками не спостерігали. Індивідуалізоване зіставлення показників засвідчило, що лише у 13,0% пацієнток збільшена ширина колагенових волокон у стромальному компоненті співпадала з II стадією пухлинного процесу, у 9,0% жінок цей показник асоціювався з люмінальним В молекулярним підтипом. В інших випадках чіткої залежності між особливостями архітектоніки колагенових структур та клініко-патологічними показниками перебігу пухлинного процесу не встановлено.

ВИСНОВКИ

1. Морфологічне дослідження особливостей стану сполучнотканинного компонента у пухлинах хворих на інвазивний протоковий РМЗ із різними співвідношеннями стромального та паренхіматозного компонентів при застосуванні забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізон показало, що найбільш виражені перебудови архітектоніки волокнистих структур, а саме колагенових волокон, відбуваються у групі пухлин з вираженими десмопластичними змінами сполучної тканини. Зокрема, це збільшення маси колагенових структур, щільності їх розташування, зростання ширини у десмопластично змінених прошарках та ступеня забарвленості, а також вирівнювання з прямолінійною спрямованістю та подовженням пікрин-позитивних волокнистих структур.

2. Зіставлення характеристик архітектоніки колагенових волокон у виділених групах пухлин хворих на інвазивний протоковий РМЗ за співвідношеннями епітеліальних та сполучнотканинних компонентів з клініко-патологічними особливостями перебігу пухлинного процесу виявило ряд закономірностей. У разі переважання у новоутвореннях епітеліальних структур і наявності тонких звисстих прошарків колагенових волокон, що їх відокремлюють, між цими показниками спостерігаються асоціації, більшість з яких свідчить про досить сприятливий перебіг захворювання: I стадія хвороби, відсутність метастазів, люмінальний А молекулярний підтип, експресія рецепторів естрогену та низькі значення експресії Ki-67. На противагу цьому, у разі переважання у пухлині десмопластично зміненої сполучної тканини зі зростанням ширини прошарків колагенових волокон, тенденції їх до сплюснення, випрямлення, подовження, морфологічна картина таких змін у пухлинному осередку асоціюється з клініко-патологічними характеристиками, що свідчать про несприятливий перебіг захворювання. В основному це менопаузальний вік хворих, II стадія пухлинного процесу, наявність регіонарних метастазів, відсутність експресії рецепторів естрогену та високі показники проліферації за Ki-67.

3. Отже, результати морфологічних та клініко-патологічних зіставлень свідчать про те, що перебіг пухлинного процесу у хворих на інвазивний протоковий РМЗ залежить не лише від стану епітеліального компонента новоутворення, але і значною мірою від особливостей сполучної тканини, зокрема від її десмопластичної перебудови та зміни архітектоніки колагенових волокон.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Mnikhovich MV, Mishina ES, Bezuglova TB, Bun'kov KV. Intercellular and cell-matrix interactions in breast carcinoma: the present state of problem. Tumors of the female reproductive system. 2018; **14** (2): 20–7.
2. Xu S, Xu H, Wang W, *et al.* The role of collagen in cancer: from bench to bedside. J Transl Med 2019; **17**: 2–22.
3. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to cancer biology. J Exp Clin Cancer Res 2019; **38**: 115. doi:10.1186/s13046-019-1110-6.
4. Attieh Y, Clark AG, Grass C, *et al.* Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin-beta3-dependent fibronectin assembly. J Cell Biol 2017; **216** (11): 1–12.
5. Lo A, Wang L-CS, Scholler J, *et al.* Tumor-promoting desmoplasia is disrupted by depleting FAP-expressing stromal cells. Cancer Res 2018; **75** (14): 2800–10.
6. Fang M, Yuan J, Peng C, Li Y. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. Tumor Biol 2014; **35** (4): 2871–82.
7. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. Cold Spring Harb Protoc; 2008; (5), pdb-prot4986. doi: 10.1101/pdb.prot073411
8. Prentø P. Van Gieson's picrofuchsin. The staining mechanisms for collagen and cytoplasm, and an examination of the dye diffusion rate model of differential staining. Histochemistry, 1993; **99**(2): 163–74.
9. Naleskina LA, Lukianova NYu, Storchai DM, *et al.* Features of architectonics of neoplasms and molecular profile of tumor cells in patients with breast cancer. Oncology 2018; **20** (3): 185–92 (in Ukrainian).
10. Zunder SM, Gelderblom H, Tollenaar RA, Mesker WE. The significance of stromal collagen organization in cancer tissue: an in-depth discussion of literature. Crit Rev Oncol. Hematol 2020; **151**: 102907. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102907.
11. Drifka CR, Loeffler AG, Mathewson, *et al.* Comparison of picro-sirius red staining with second harmonic generation imaging for the quantification of clinically relevant collagen Fiber Features in histopathology samples. J Histochem Cytochem 2016; **64** (9): 519–29.
12. Yuting L, Li C, Zhou K, *et al.* Microscale characterization of prostate biopsies tissues using optical coherence elastography and second harmonic generation imaging. Lab Invest 2018; **98**: 380–90.
13. Dekker TJ, Charehbili A, Smit VT, *et al.* Disorganised stroma determined on pre-treatment breast cancer biopsies is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy: results from the NEOZOTAC trial. Mol Oncol 2015; **9** (6): 1120–8.
14. Hanley CJ, Noble F, Ward M, *et al.* A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers. Oncotarget 2016; **7** (5): 6159–74.
15. Martinez J, Smith PC. The dynamic interaction between extracellular matrix remodeling and breast tumor progression. Cells 2021; **10** (5): 1046. doi: 10.3390/cells10051046.
16. Cavaco ACM, Dâmaso S, Casimiro S, Costa L. Collagen biology making inroads into prognosis and treatment of cancer progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev 2020; **39** (3): 603–23.

FEATURES OF ARCHITECTONICS OF COLLAGEN STRUCTURES IN TUMORS OF BREAST CANCER PATIENTS WITH DIFFERENT MANIFESTATIONS OF STROMAL REMODELING

L.A. Naleskina, N.Yu. Lukianova, T.V. Zadvornyi,
L.M. Kunska, V.F. Chekhun

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. In recent years, desmoplastically altered connective tissue of the tumor stromal component is believed to be the most important driving force of tumor progression in patients with breast cancer (BC) that is due to type I collagen, which is associated with tumor cell metastasis and the adverse course of the disease. **Aim:** to identify some features of the architecture of collagen structures in the tumors of invasive ductal BC with the different ratio of epithelial and stromal components and to establish the relations between the features and clinical and pathological characteristics of the patients. **Object and methods:** the histological preparations of 69 patients with BC stained with picrofuchsin by van Gieson's method were analyzed. The obtained results were compared with the clinical and pathological characteristics of the patients. **Results:** it is shown that the most pronounced rearrangements of the architecture of fibrous structures, namely collagen fibers, occur in the group

of neoplasms with a predominance of desmoplastically altered connective tissue: an increase in the mass of collagen structures, in its density and the width of the layers, their alignment, rectilinear orientation, elongation of fibrous structures. The comparison of the obtained data in the selected groups of tumors of BC patients with clinical and pathological features of the disease revealed several patterns that are associated with the proliferative potential of the tumors, their receptor status, molecular subtype, age, stage of the disease and presence of regional metastases. **Conclusion:** on the material of patients with the invasive ductal BC, the results of morphological and clinical-pathological comparisons indicate that the tumor process depends not only on the epithelial component of the tumor but also, to a greater extent, on the characteristics of connective tissue including its desmoplastic rearrangement and changes in the collagen architecture.

Key Words: invasive ductal breast cancer, architecture of collagen fibers, parenchymal/stromal ratio, desmoplastic changes.

Адреса для листування:

Налескіна Л.А.

03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,

E-mail: Naleskina@ukr.net

Одержано: 10.12.2021