

PRACE ORYGINALNE

Anna Goździalska¹, Anna Gawędzka¹, Jagoda Drag¹, Małgorzata Knapik-Czajka¹, Anna Siekanowicz¹, Adrian Kuźdżał^{2,3}, Jerzy Jaśkiewicz¹

Ekspresja kolagenu typu III i IV w nowotworach piersi

¹Z Zakładu Analityki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Analityki Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

²Z Instytutu Fizjoterapii Wydziału Medycznego Uniwersytetu Rzeszowskiego

³Z Krakowskiej Wyższej Szkoły Promocji Zdrowia

Wprowadzenie: Rak piersi jest drugim co do częstości występowania nowotworem u kobiet na świecie, a w Polsce stanowi główną przyczynę zgonów na nowotwory złośliwe. Struktura tkanek, zarówno zdrowych, jak i w obrębie guzów piersi, utrzymywana jest przez składniki macierzy pozakomórkowej, w tym także przez włókna kolagenowe. Stopień degradacji kolagenu zależy m. in. od aktywności metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs). Zależność pomiędzy procesem syntezy i degradacji macierzy pozakomórkowej jest kluczowym czynnikiem w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania tkanki gruczołu piersiowego. U pacjentów z rakiem zaburzenie powyższej korelacji odzwierciedla dynamikę infiltracji komórek nowotworowych.

Celem pracy było oznaczenie ekspresji kolagenu typu III oraz typu IV w gruczole piersiowym kobiet, u których wcześniej zdiagnozowano raka piersi.

Materiał i metody: Materiał pobrano od pacjentek, w trakcie zabiegu operacyjnego. Każdej pacjentce została pobrana tkanka nowotworowa oraz tkanka prawidłowa gruczołu piersiowego. Pacjentki podzielono na dwie grupy względem wieku. Analizę ekspresji białek kolagenowych III i IV wykonano techniką Western blot z detekcją chemiluminescencyjną. Wyniki uzyskane dla białek kolagenowych III i IV z tkanek guza i tkanek prawidłowych przedstawiono jako średnią wartość ekspresji \pm SD. Testem D'Agostino oceniono normalność rozkładu, a dla sprawdzenia różnic pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną użyto testu parametrycznego t-Studenta oraz testu kolejności par Wilcoxon.

Wyniki: Stwierdzono ekspresję obu typów kolagenu w tkankach nowotworowych oraz tkankach rozpoznanych histopatologicznie jako prawidłowe, pochodzące z marginesów operacyjnie usuniętego nowotworu piersi. U pacjentek w grupie wiekowej do 55 roku życia stwierdzono wyższą ekspresję kolagenu typu IV w tkankach prawidłowych, natomiast w grupie wiekowej powyżej 55 roku życia ekspresja kolagenu IV była wyższa w tkance nowotworowej. Stwierdzono różnice istotne statystycznie pomiędzy tkanką nowotworową a zdrową w ekspresji kolagenu typu IV tylko w grupie powyżej 55 roku życia.

Wnioski: Odmienna ekspresja białek kolagenowych w tkankach prawidłowych w stosunku do tkanek nowotworowych może stać się jednym z markerów stosowanych w diagnostyce raka piersi.

Słowa kluczowe: rak piersi, kolagen typu III, kolagen typu IV

Expression of collagen type III and type IV in breast cancer

Introduction: Breast cancer is the most common cause of cancer death in women in Poland and it is the second most frequent cancer in women worldwide. The structure of both healthy as well as tumor breast tissue is maintained by extracellular matrix components including collagens. The rate of collagens degradation depends on matrix metalloproteinases (MMPs) activities. In non tumor tissue the turnover rate of extracellular matrix is the crucial factor in preserving the proper function of the breast tissue, while in cancer it reflects the dynamics of tumor cell infiltration.

The main objective of our study was to determine the expression of collagen type III and type IV proteins in breast tissue obtained from women with diagnosed breast cancer.

Materials and Methods: From each patient two specimens of breast tissue were taken during mastectomy, one from the tumor center and the second from the bordering healthy tissue (control group). Expression of both types of collagen proteins was evaluated by Western blot technique with chemiluminescence detection. The results obtained for collagen III and IV of the tumor and nontumor tissue, were expressed as a mean value \pm SD of collagen expression. D'Agostino test for normality of distribution was assessed. The parametric test (*t*-Student's test) and Wilcoxon pair sequence were used to verify the results.

Results: The results of this study demonstrated the expression of type III and type IV collagen proteins in both tumor and non tumor breast tissue. The expression of different types of collagen according to age was demonstrated. Patients in the group up to 55 years of age found a higher expression of type IV collagen in the nontumor tissues, while in the group above 55 years of age the expression of collagen IV was higher in the tumor. Statistically significant differences in the expression of collagen type IV between tumor and non tumor tissue, in only the group over 55 years of age were found.

Conclusions: The different expression of collagen proteins in tumor and nontumor tissues may be one of the markers used in breast cancer diagnostics.

Key words: breast cancer, collagen type III, collagen type IV

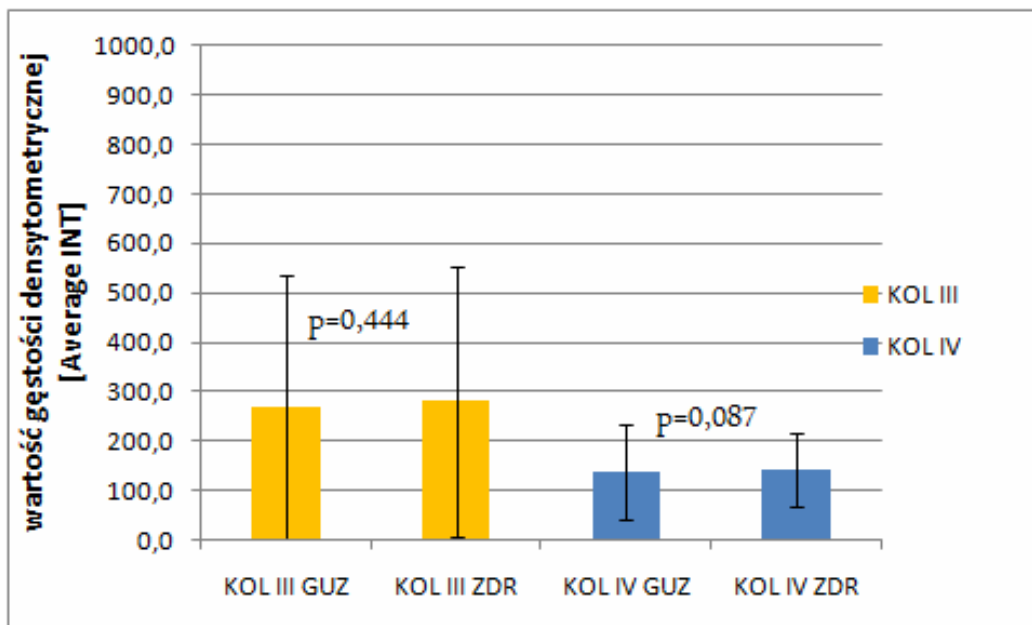
WSTĘP

Rak piersi jest drugim co do częstości występowania nowotworem u kobiet na świecie, a w Polsce stanowi główną przyczynę zgonów na nowotwory złośliwe. Do czynników zwiększających ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu należą płeć, wiek, pierwsza ciąża w późnym wieku, stan hormonalny oraz uwarunkowania genetyczne. Pierwsze potwierdzone dane o genetycznych uwarunkowaniach raka piersi pojawiły się w latach 80. Obecnie szacuje się, że 5 do 10% zmian nowotworowych gruczołu piersiowego i jajnika wiąże się z predyspozycją genetyczną [1, 2]. Wyniki badań epidemiologicznych potwierdzają, że istotny wpływ na powstanie, rozwój oraz przebieg choroby nowotworowej mają również dieta, otyłość oraz tryb życia [3–5].

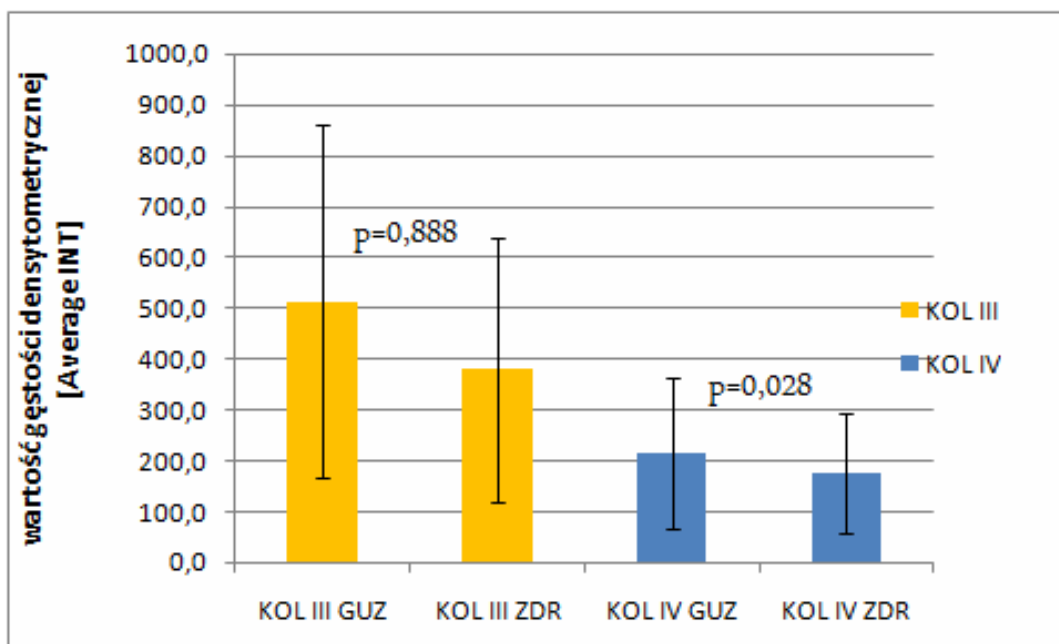
Profilaktyczne badania, takie jak mammografia, ultrasonografia i badanie palpacyjne pozwalają na dość wczesne rozpoznanie, ale nadal w dużym odsetku choroba wykrywana jest w stadium zaawansowanym. Co roku w Polsce rozpoznawanych jest ok. 10 tys. nowych przypadków występowania raka piersi u kobiet.

Rak piersi stanowi heterogenną grupę guzów o różnym rokowaniu i agresywności, które zależą od zdolności komórek nowotworowych do naciekania sąsiadujących tkanek. W rozwoju i przerzutach raka piersi największe znaczenie mają procesy degradacji macierzy pozakomórkowej (*extracellular matrix* – *ECM*) oraz składników błony podstawnej (*basement membrane* – *BM*). W skład *ECM* wchodzi m.in. białka kolagenowe, proteoglikany, lamininy oraz fibronektyna. Białka ko-

lagenowe są również jednym z ważniejszych składników *BM*. *BM* wraz z nabłonkiem wyściełającym, a także naczyniami krwionośnymi stanowią pierwszą barierę, przez którą muszą przedostać się komórki przerzutujące [6–9]. Kolagen typu III stanowi ok. 15% masy białka kolagenowego, syntetyzowany jest między innymi w mięśniach gładkich, fibroblastach, retikulocytach, hepatocytach i komórkach Schwanna. Kolagen typu IV występuje głównie w błonie podstawnej, blaszce podstawnej nabłonka i śródbłonka, gdzie nie tworzy włókien. Kolagen IV jest syntetyzowany i odkładany podczas tworzenia naczyń krwionośnych wokół komórek endotelialnych i komórek przydanki. Może być zatem uznawany jako marker aktywności procesu angiogenezy [10–12]. Proteoliza kolagenu typu IV, który jest substratem dla metaloproteinaz (*matrix metalloproteinases* *MMPs*) jest procesem początkującym degradację błony podstawnej. *MMPs* należą do rodziny endopeptydaz, które w centrum katalitycznym posiadają jon cynku (Zn^{2+}). W warunkach fizjologicznych *MMPs* syntetyzowane są przez fibroblasty, leukocyty, monocyty, makrofagi, granulocyty obojętnochłonne, komórki śródbłonka i keratynocyty. W warunkach patologicznych również komórki nowotworowe wykazują zdolność od syntezy *MMPs* [10–12]. W raku piersi potwierdzona jest nadmierna aktywacja proteolizy zewnątrzkomórkowej, która wiąże się z zaburzeniami regulacji aktywności *MMPs* [13–14]. Zwiększona proteoliza przyczynia się do ułatwienia migracji komórek nowotworowych i tym samym tworzenia przerzutów [15].



RYC. 1. Zależność ekspresji kolagenu III i IV w grupie pacjentek do 55 roku życia. GUZ – oznacza tkankę nowotworową pobraną z miejsca zmienionego nowotworowo, ZDR – oznacza tkankę ocenioną histopatologicznie jako prawidłowa.
 FIG. 1. Dependence of expression of collagen III and IV in the group of patients up to 55 years of age. GUZ – the tumor tissue, ZDR - the tissue histologically validated as healthy.



RYC. 2. Zależność ekspresji kolagenu III i IV w grupie pacjentek powyżej 55 roku życia. GUZ – oznacza tkankę nowotworową pobraną z miejsca zmienionego nowotworowo, ZDR – oznacza tkankę ocenioną histopatologicznie jako prawidłowa.

FIG. 2. Dependence of expression of collagen III and IV in the group of patients over 55 years of age. GUZ - the tumor tissue, ZDR - the tissue histologically validated as healthy.

Celem pracy było oznaczenie ekspresji kolagenu typu III oraz typu IV w tkance nowotworowej gruczołu piersiowego oraz w tkance zdrowej, pobranych od tej samej pacjentki. Badania ekspresji kolagenu typu III i IV wykonano techniką Western blot, w której detekcję prowadzono metodą chemiluminescencyjną.

MATERIAŁ I METODY

MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiły wycinki centrum guza oraz tkanka nienowotworowa gruczołu piersiowego kobiet (grupa kontrolna). Materiał pobrano w trakcie zabiegu operacyjnego od 20 pacjen-

tek, u których wcześniej zdiagnozowano, przy pomocy badania histopatologicznego, nowotwór piersi. Wiek pacjentek wynosił od 37 do 87 lat. Pacjentki zostały podzielone na dwie grupy: do 55 roku życia i powyżej 55 roku życia. W trakcie zabiegu rutynowo przeprowadzono badania histopatologiczne. Wszystkie nowotwory zostały sklasyfikowane w stopniu G3 wg skali Blooma – Richardsona. Na podstawie decyzji Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego uzyskano zgodę na wykonanie planowanych analiz. Próbkki zaraz po pobraniu umieszczano w ciekłym azocie, a do momentu wykonania oznaczeń przechowywano w temperaturze -80°C .

WESTERN BLOT

Tkanki gruczołu piersiowego (100 mg) homogenizowano, a w uzyskanym supernatancie oznaczono stężenie białka całkowitego metodą biuretową. Próbkki poddano elektroforezie SDS PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym (Mini Protein Tetra Cell, Bio-Rad, USA). Każdorazowo do studzienek nakładano 40 μg białka poddanego uprzednio denaturacji termicznej (100°C , 5 min). Prowadzono elektroforezę SDS PAGE w temperaturze pokojowej (50 mA i 150 V). Żele poddawano elektrotransferowi na membrany nitrocelulozowe w buforze (Tris-base, glicyna, metanol, pH 8,3), używając zestawu Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell firmy Bio-Rad (USA) (20 V, 0,3 mA, 30 min). Membrany blokowano w 5% roztworze odfluszczonego mleka w proszku w TBST, (4°C , 12 godz.), stale mieszając. Po blokowaniu membrany płukano wodą destylowaną, a następnie trzykrotnie buforem TBST. W kolejnych etapach procedury membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi, monoklonalnymi Anti – Human, Collagen type III (mouse), Anti – Human, Collagen type IV (mouse) (MBL Int.Co). Po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi membrany płukano jednokrotnie wodą destylowaną i trzykrotnie buforem TBST. Następnie membrany inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi poliklonalnymi Immuno 0 Anti – Mouse IgG (Goat) H + L Affin, HRP Conj. Inkubację z przeciwciałami II-rzędowymi prowadzono przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. W celu wywołania reakcji chemiluminescencji stosowano odczynniki ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham, UK). Po 30 sekundach naświetlania wywoływano i utrwalano (Kodak, Sigma, USA) obraz identyfikowanych białek na kliszy fotograficznej (Amersham, UK). Otrzymane na kliszach fotograficznych wyniki opracowa-

no przy użyciu programu do obróbki densytometrycznej – Quantity One – 4.6.7.

ANALIZA STATYSTYCZNA

W celu sprawdzenia różnic pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną stosowano test parametryczny t-Studenta oraz test kolejności par Wilcoxon, przy założonym poziomie istotności $p < 0,05$. Do obliczeń statystycznych wykorzystano program Statistica 8.

WYNIKI BADAŃ

KOLAGEN A WIEK

Ekspresję kolagenu III i IV zależną od wieku pacjentek przedstawiono na rycinach 1 i 2. Stwierdzono różnicę znamioną statystycznie ($p < 0,05$) pomiędzy poziomem ekspresji kolagenu IV w tkance zdrowej i tkance zmienionej nowotworowo w przedziale wiekowym powyżej 55 roku życia. Zaobserwowano wyższą ekspresję kolagenu typu III w porównaniu z kolagenem typu IV we wszystkich badanych próbkach.

DYSKUSJA

Celem eksperymentu było poznanie ekspresji białek kolagenowych typu III i IV w tkankach nowotworowych gruczołu piersiowego, które zostały usunięte podczas zabiegu chirurgicznego i w tkankach niezmiennych nowotworowo, pobranych jako margines guza.

Wśród pacjentek wyróżniono dwie grupy wiekowe – do 55 roku (ryc. 1) i powyżej (ryc. 2). Przyjęto wiek 55 lat, jako średni wiek menopauzalny. Stwierdzono, że do 55 roku życia zarówno dla kolagenu III jak i IV przeważają wyniki, w których wartość ekspresji białek kolagenowych w tkance niezmiennych nowotworowo jest wyższa, niż w tkance nowotworowej. Natomiast dla pacjentek po 55 roku życia dla kolagenu III i IV przeważają wyniki, w których wartość ekspresji kolagenu w tkance nowotworowej jest wyższa niż w tkance niezmiennych nowotworowo. Stwierdzono różnicę znamioną statystycznie ($p = 0,028$) w ekspresji białka kolagenowego typu IV pomiędzy tkanką prawidłową a tkanką zmienioną nowotworowo w grupie wiekowej powyżej 55 roku życia.

Bezpośrednim następstwem zmian w gruczole piersiowym w okresie menopauzy, związanych ze zmniejszaniem się stężenia żeńskich hormonów płciowych, jest zaobserwowana zależność w ekspresji kolagenu. Ekspresja kolagenu w gruczole piersiowym u młodej pacjentki jest inna niż u kobiety w podeszłym wieku. Gruczoł piersiowy

ulega w tym czasie znacznej inwolucji. Zanikają elementy budujące gruczoł, takie jak pęcherzyki wydzielnicze oraz sieci przewodów mlekonosnych. Zmniejsza się liczba komórek tworzących tkankę łączną zrębu, a zwiększa się ilość tkanki tłuszczowej. W związku z tymi zmianami u kobiet starszych przeważa ekspresja kolagenów typu III i IV w tkance nowotworowej gruczołu piersiowego, w stosunku do tkanki gruczołu piersiowego ocenianej na podstawie kryterium badania histopatologicznego jako zdrowa.

Można też wnioskować, że z procesem rozwoju guza związane są również inne białka wchodzące w interakcje z białkami kolagenowymi. W patologicznych warunkach, jakimi są procesy nowotworzenia, komórki transformowane nabywają zdolności do syntezy enzymów degradujących ECM, co też może być przyczyną zaburzeń w obrębie struktury tkanki gruczołu piersiowego. Niepodlegająca kontroli synteza enzymów proteolitycznych, w tym MMPs, zmienia fizjologiczne podścielisko tkanki, i tak już mocno zmienione w związku z osiągniętym przez organizm wiekiem. Ponadto zwiększona aktywność tych czynników proteolitycznych prowadzić może paradoksalnie do wzrostu ekspresji genów kodujących kolageny. Swoista nadprodukcja kolagenu byłaby obroną komórek przed niszczeniem podścieliska. Przypuszcza się jednak również, że degradacja kolagenu typu IV, m. in. przez metaloproteinazy, prowadzi do odsłonięcia specyficznej sekwencji w strukturze białka, która sprzyja procesowi angiogenezy i wzrostu guza. Dlatego też w intensywnie proliferujących i przerzutujących nowotworach, zwłaszcza u osób starszych, może się zaznaczać wyższa ekspresja białek kolagenowych. Szczególnie podatny na takie zmiany byłby kolagen typu IV, umożliwiający tworzenie naczyń krwionośnych guza, co sprzyja przerzutowaniu. Przedstawione powyżej badania stanowią argument przemawiający za taką właśnie hipotezą.

W celu pełnego zobrazowania zależności ekspresji białek kolagenowych w procesie nowotworzenia konieczne jest poznanie ekspresji na poziomie mRNA. Pozwoli to wyjaśnić czy poziom ekspresji białka kolagenowego wzrasta w wyniku wzmożonej transkrypcji mRNA, lub też czy regulacja dotyczy innego poziomu ekspresji genów dla kolagenu.

Dodatkowo, warto wziąć pod uwagę jeszcze inny powód uzyskania powyższych wyników. Badania, na podstawie których dokonuje się obecnie rozróżnienia pomiędzy tkanką prawidłową a tkanką zmienioną nowotworowo nie pozwalają na

precyzyjne rozpoznanie. Tkanka traktowana jako prawidłowa na podstawie badania histopatologicznego może wykazywać już cechy zmian nowotworowych. Tkanka nieprawidłowa uważana może być za zdrową, w związku z niejednorodnym utkaniem komórek zmienionych nowotworowo. Stąd również mogą wynikać zaobserwowane różnice w poziomach ekspresji białek kolagenowych w tkankach gruczołu piersiowego, ponieważ wyjściowo tkanka mogła zostać błędnie sklasyfikowana. Sugerować można byłoby zatem, że badania molekularne tkanek mogą być użyteczne, jako bardzo czułe, w celu weryfikacji badań histopatologicznych. Dlatego uzupełnienie badań o markery molekularne pozwoliłoby na precyzyjne określenie granicy marginesu wyciętego guza, co ma duże znaczenie rokownicze.

WNIOSKI

1. Stwierdzono ekspresję kolagenu typu III i IV w tkankach nowotworowych oraz tkankach rozpoznanych histopatologicznie jako zdrowe, pochodzących z marginesów operacyjnie usuniętego nowotworu piersi.
2. Stwierdzono wyższą ekspresję białka kolagenowego typu III niż kolagenu typu IV we wszystkich tkankach.
3. Stwierdzono różnice istotne statystycznie w ekspresji kolagenu typu IV pomiędzy tkanką nowotworową a tkanką prawidłową w grupie wiekowej powyżej 55 roku życia.
4. Odmienna ekspresja białek kolagenowych w tkankach prawidłowych w stosunku do tkanek nowotworowych może stać się jednym z markerów stosowanych w diagnostyce raka piersi

PIŚMIENNICTWO

1. Kozak A., Sielużycka J., Pronobis J., Ząbkowska K., Górnasiowa M., Pawlak W.Z.: *Genetic testing for hereditary breast and ovarian cancer susceptibility*, *Współcz Onkol* 2002; 6:201–204.
2. Bednarek A., Pluciennik E., Kordek R., Kusińska R.: *New molecular prognostic factors in patients with breast cancer*, *Współcz Onkol* 2004; 8:296–302.
3. Michels K.B., Mohllajee A.P., Roset-Bahmanyar E., Beehler G.P., Moysich K.B.: *Diet and breast cancer. A review of the prospective observational studies*, *Cancer* 2007; 109:2712–2749.
4. Li C.I., Daling J.R., Malone K.E., Bernstein L., Marchbanks P.A., Liff J.M., et al.: *Relationship between established breast cancer risk factors and risk of seven different histologic types of invasive breast cancer*, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 946–954.
5. Makowski M., Połać I., Pertyński T.: *Estrogeny a rak sutka*, *Przegląd Menopauzalny* 2007; 11:150–154.

6. Provenzano P.P., Inman D.R., Eliceiri K.W., Knittel J.G., Yan L., Rueden C.T., White J.G., Keely P.J.: *Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression*, BMC Med 2008; 6:11.
7. Baluk P., Morikawa S., Haskell A., Mancuso M., McDonald D.M.: *Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. Am J Pathol 2003; 163: 1801–1815.
8. Mazouni C., Arun B., André F., Ayers M., Krishnamurthy S., Wang B. et al.: *Collagen IV levels are elevated in the serum of patients with primary breast cancer compared to healthy volunteers*, Br J Cancer 2008; 99: 68–71.
9. Xu J., Rodriguez D., Petitclerc E., Kim J.J., Hangai M., Moon Y.S., Davis G.E., Brooks P.C.: *Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo*, J Cell Biol 2001; 154:1069–1080.
10. Liu S.C., Yang S.F., Yeh K.T., Yeh C.M., Chiou H.L., Lee C.Y., Chou M.C., Hsieh Y.S.: *Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer*, Clin Chim Acta 2006; 371:92–96.
11. Kass L., Erler J.T., Dembo M., Weaver V.M.: *Mammary epithelial cell, influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumor genesis*, J Biochem Cell Biol 2007; 39:1987–94.
12. Jarocka-Cyrta E., Bańkowski E.: *Zawartość i polimorfizm molekularny kolagenu w sutku objętym procesem łagodnej dysplazji*, Polski Tygodnik Lekarski 1991; 46:981–983.
13. Egeblad M., Werb Z.: *New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression*, Nat Rev 2002; 2:161–174.
14. Murphy G., Nagase H.: *Progress in matrix metalloproteinase research*. Mol Aspects Med 2008; 29:290–308.
15. McCaw A., Ewald A.J., Werb Z.: *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling*, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2007; 8: 221–233.

Dr n. farm. Anna Goździalska
Collegium Medium
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Analityki Medycznej
Zakład Analityki Biochemicznej
ul. Medyczna 9
30- 688 Kraków
tel: 012 620-56-60
anna.gozdzialska@gmail.com

Praca wpłynęła do Redakcji: 27 kwietnia 2010
Zaakceptowano do druku: 1 czerwca 2010