

## Гетерогенность опухолеассоциированных фибробластов в колоректальном раке

© Н.А. ОЛЕЙНИКОВА<sup>1</sup>, О.А. ХАРЛОВА<sup>1</sup>, Н.В. ДАНИЛОВА<sup>1</sup>, И.А. МИХАЙЛОВ<sup>1</sup>, П.Г. МАЛЬКОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

### РЕЗЮМЕ

Опухолеассоциированные фибробласты (CAF) — неэпителиальные неиммунные клетки с мезенхимными свойствами, расположенные в строме опухоли или по ее краю. CAF выявлены для большинства солидных опухолей, в том числе колоректального рака, описана их роль в прогрессии опухоли.

**Материал и методы.** На материале 21 случая аденокарциномы толстой кишки проведено иммуногистохимическое исследование с пятью антителами ( $\alpha$ SMA, POD, FAP, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ) с целью выявления CAF в трех зонах опухоли: апикальной, центральной и инвазивном крае. Использовали технологию дуплексной метки — на одном срезе параллельно проводили реакции с исследуемым маркером и с антителами к  $\alpha$ SMA. Методом цветоделения в программе LAS X выделяли и подсчитывали площадь каждой метки. Для статистической обработки использовали программу Statistica 10.

**Результаты.** Выявлены более высокий уровень экспрессии POD в апикальной части и  $\alpha$ SMA в инвазивном крае, а также выраженная экспрессия PDGFR $\beta$ , схожая во всех зонах. Корреляционный анализ определил сильную обратную связь между уровнем  $\alpha$ SMA и FAP в центральной зоне ( $r=0,79$ ,  $p=0,034$ ), что свидетельствует о разном биологическом значении FAP и  $\alpha$ SMA в отношении CAF и о том, что эти маркеры с малой долей вероятности могут выявлять одни и те же субпопуляции CAF. Установлены две сильные тенденции прямых взаимосвязей в центральной зоне в паре переменных  $\alpha$ SMA/PDGFR $\alpha$  и POD/PDGFR $\alpha$  ( $p=0,06$  и  $p=0,07$  соответственно) и слабая тенденция в паре переменных PDGFR $\beta$ /PDGFR $\alpha$  ( $r=0,62$ ,  $p=0,054$ ). Впервые выявлены различия в расположении маркеров относительно опухолевых (эпителиальных) комплексов: в части случаев ближайшим слоем оказался  $\alpha$ SMA, а в части — POD или FAP. Также отмечены смешанные случаи, где внутренний слой представлен сразу двумя маркерами.

**Заключение.** Полученные данные побуждают к проведению дополнительных исследований CAF и их особенностей на большем объеме материала с целью лучшего понимания молекулярно-биологических характеристик колоректального рака.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, опухолеассоциированные фибробласты, дуплексная метка, иммуногистохимия, опухолевое микроокружение, строма опухоли.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Олейникова Н.А. — <https://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Харлова О.А. — <https://orcid.org/0000-0002-5909-1248>

Мальков П.Г. — <https://orcid.org/0000-0001-5074-3513>

Михайлов И.А. — <https://orcid.org/0000-0001-8020-369X>

Данилова Н.В. — <https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Олейникова Н.А., Харлова О.А., Данилова Н.В., Михайлов И.А., Мальков П.Г. Гетерогенность опухолеассоциированных фибробластов в колоректальном раке. *Архив патологии*. 2020;82(4):5–12. <https://doi.org/10.17116/patol2020820415>

## Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer

© N.A. OLEYNIKOVA<sup>1</sup>, O.A. KHARLOVA<sup>1</sup>, N.V. DANILOVA<sup>1</sup>, I.A. MIKHAILOV<sup>1</sup>, P.G. MALKOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

### ABSTRACT

**Introduction.** Cancer-associated fibroblasts (CAF) are non-epithelial non-immune cells with mesenchymal properties located in the stroma of the tumor or along its margin. CAFs are described for most solid tumors, including colorectal cancer, as well as their role in tumor progression.

**Materials and methods.** An immunohistochemical study with 5 antibodies ( $\alpha$ SMA, POD, FAP, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ) was performed in 21 cases of colon adenocarcinoma in order to detect CAF in three tumor zones: apical, central and invasive region. Double staining immunohistochemical technology was used — in parallel with each marker a reaction with antibodies to  $\alpha$ SMA was performed on one section. The color-separation method in the LAS X program was used to extract and calculate the area of each mark. Statistica 10 software was used for statistical analysis.

**Results.** The study revealed a higher level of POD expression in the apical part and  $\alpha$ SMA in the invasive region. Expression of PDGFR $\beta$  is significant and similar in all zones. Correlation analysis revealed a strong inverse correlation between the level of  $\alpha$ SMA and FAP in the central zone ( $r=0.79$ ,  $p=0.034$ ), that indicates different biological roles of FAP and  $\alpha$ SMA in the context of CAFs.

Автор, ответственный за переписку: Олейникова Н.А. — e-mail: [ale\\_x\\_05@mail.ru](mailto:ale_x_05@mail.ru)

Corresponding author: Oleynikova N.A. — e-mail: [ale\\_x\\_05@mail.ru](mailto:ale_x_05@mail.ru)

Also it indicates that these markers are unlikely to reveal the same CAF subpopulations. Two strong trends of direct correlation are detected in the central zone in pairs  $\alpha$ SMA/PDGFR $\alpha$  and POD/PDGFR $\alpha$  ( $p=0.06$  and  $p=0.07$ , respectively) and a weak trend of direct correlation is found in a pair PDGFR $\beta$ /PDGFR $\alpha$  ( $r=0.62$ ,  $p=0.054$ ). For the first time, differences in the location of markers relative to tumor (epithelial) complexes were revealed: in some cases the closest layer was  $\alpha$ SMA, and in some others — POD or FAP. Mixed cases were also noted — the inner layer was represented by two markers at once.

**Conclusion.** The obtained data encourage to pursue more researches of CAF and their features on a larger series to increase the understanding of the molecular and biological characteristics of colorectal cancer.

**Keywords:** colorectal cancer, cancer-associated fibroblasts, double staining, immunohistochemistry, tumor microenvironment, tumor stroma.

#### INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Oleynikova N.A. — <https://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Kharlova O.A. — <https://orcid.org/0000-0002-5909-1248>

Danilova N.V. — <https://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Mikhailov I.A. — <https://orcid.org/0000-0001-8020-369X>

Malkov P.G. — <https://orcid.org/0000-0001-5074-3513>

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Oleynikova NA, Kharlova OA, Danilova NV, Mikhailov IA, Malkov PG. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2020;82(4):5–12. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol2020820415>

Ответ организма-хозяина на развивающуюся опухоль предполагает сложные взаимодействия эпителиальных опухолевых клеток с клетками организма, которые обозначаются как десмопластическая реакция, или опухолевая трансформация стромы. Иммунные клетки, капилляры, базальная мембрана, активированные фибробласты и внеклеточный матрикс, окружающие опухолевые клетки, представляют собой опухолевую строму, или опухолевое микроокружение (tumor microenvironment, TME) [1]. Как стало понятно в последнее время, прогрессия опухоли и метастазирование контролируются TME и не зависят исключительно от автономных генетических дефектов опухолевых клеток [2]. Одним из ключевых компонентов опухолевой стромы являются опухолеассоциированные фибробласты (cancer-associated fibroblasts, CAF) — неэпителиальные неиммунные клетки с мезенхимными свойствами, расположенные в строме опухоли или по ее краю [3]. В сравнении с нормальными активированными фибробластами CAF характеризуются повышенным синтезом факторов роста и хемокинов, обладают большей пролиферативной активностью, способностью к передвижению. По некоторым данным [1], CAF также могут включать ассоциированные с опухолью мезенхимальные стволовые клетки (cancer-associated mesenchymal stem cells, MSC). CAF являются одним из ключевых компонентов опухолевой прогрессии и обеспечивают широкий спектр фиброзных изменений в строме в большинстве известных опухолей. В частности, CAF продуцируют белки, разрушающие внеклеточный матрикс (матриксные металлопротеиназы — MMP), обеспечивая миграцию опухолевых клеток. CAF описаны для большого количества опухолей, в том числе для колоректального рака [3].

Общепризнанным маркером активированных фибробластов, в частности CAF, является гладкомышечный альфа-актин ( $\alpha$ SMA), который также экспрессируется в гладкомышечных клетках и нормальных перикрипальных фибробластах [4]. Другими маркерами CAF считаются белок активации фибробластов (FAP), рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR $\alpha$ ) и PDGFR $\beta$ ), подоплатин (POD)[5]. Все обозначенные маркеры не являются специфичными для CAF. Так, FAP также экспрессируется воспалительными клетками, PDGFR выявляются на пери-

цитах [1, 6], POD — в лимфатических сосудах. Некоторые маркеры, используемые для оценки CAF, также характерны для нормальных активированных (не покоящихся) перикрипальных фибробластов.

Опухоли иногда представляют как «раны, которые не заживают», так как длительное накопление опухолевых клеток в любой ткани инициирует хроническую репаративную реакцию. Роль миофибробластов в заживлении ран достаточно исследована и понятна, но их функциональная роль в прогрессировании рака и метастазировании сложна и противоречива. Некоторые исследования свидетельствуют о том, что CAF могут не только способствовать прогрессии опухоли, но и сдерживать ее развитие [7, 8]. Выявление специфичных маркеров CAF, оценка их роли в канцерогенезе и разработка таргетных препаратов — важные этапы в развитии диагностики и лечении колоректального рака.

## Материал и методы

В исследование включен 21 случай аденокарциномы толстой кишки без метастазов. Отбирали блоки из центральной (некраевой) части опухоли. Для идентификации CAF использовали моноклональные антитела к POD (Abcam, клон EPR22182), FAP (Abcam, клон SP325), PDGFR $\alpha$  (Abcam, клон EPR22059-270), PDGFR $\beta$  (Abcam, клон Y92). Использована технология дуплексной метки — на каждом из срезов параллельно проводили две реакции: с одним из исследуемых маркеров CAF и с антителами к гладкомышечному альфа актину ( $\alpha$ SMA). Детекцию дуплексной метки осуществляли с помощью набора Double Stain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red, Abcam ab210061) по методике, рекомендованной производителем. На всех срезах  $\alpha$ SMA окрашивали зеленым цветом, а любой второй исследуемый маркер — красным. Предварительную обработку (депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигенов) проводили в PT-Module (Thermo Scientific, Англия) в течение 20 мин (95–98 °C) при pH 8,0. Блокировку эндогенных ферментов проводили последовательно с помощью Hydrogen Peroxide Block (Ultra Vision Quanto Detection System HRPDAB) и 1 мМ раствора левамизола (по 10 мин). Иммуногистохимические реакции осуществляли в полуавтоматическом

режиме с использованием автостейнера Autostainer 480S (Thermo Scientific, Англия).

Полученные препараты оценивали с помощью микроскопа Leica DM4000B, камеры Leica DFC495 и специализированной системы продвинутого морфометрического анализа LASX, в которой методом цветоделиения проводили выделение и подсчет площади красной и зеленой меток по отдельности. В каждом случае осуществляли оценку при увеличении объектива в 20 раз в трех зонах опухоли: апикальной (ближайшей к просвету органа), центральной и в инвазивном крае. Зона интереса — области с выраженной стромой и максимально выраженными реакциями обоих маркеров (рис. 1). Из подсчета исключали реакцию  $\alpha$ SMA в стенках сосудов, мышечной пластинке слизистой оболочки и мышечном слое стенки кишки. Полученные значения площади каждой метки далее по тексту обозначены как «значение маркера», «показатель», «уровень экспрессии».

Для статистической обработки полученных данных использовали программный пакет Statistica 10 (StatSoft, Inc., США).

Анализ колокализации маркеров проводили в 2-элементных группах, составленных из 5-элементного множества. Число анализируемых пар переменных рассчитывали на основании формулы классической комбинаторики для расчета биномиального коэффициента:

$$C_n^k = \frac{n!}{k! \cdot (n-k)!},$$

$$C_5^2 = \frac{5!}{2! \cdot (5-2)!} = \frac{5!}{2! \cdot 3!} = \frac{4 \cdot 5}{1 \cdot 2} = 10.$$

Всего проанализировано 10 попарных сочетаний маркеров, а с учетом разделения каждого препарата на три зоны (апикальная, центральная части и инвазивный край опухоли) число пар переменных составило 30.

В качестве меры локализации маркеров использовали коэффициент линейной корреляции Пирсона (Pearson).

Значимость различий в уровне экспрессии маркеров устанавливали с помощью параметрических и в ряде случаев — непараметрических методов. Из параметрических методов использовали одно- и многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и  $F$ -тест. Проверку характера распределения проводили на основании критериев Шапиро—Уилка (Shapiro—Wilktest) и Колмогорова—Смирнова. Из непараметрических методов для попарного сравнения применяли критерий Манна—Уитни (Mann—Whitney  $U$ -test); для множественного сравнения — критерий Краскала—Уоллиса (Kruskal—Wallistest).

## Результаты и обсуждение

Настоящая работа не была нацелена на выявление потенциальных прогностических характеристик субпопуляций CAF, ввиду чего подбирались максимально однородная выборка: в исследование включены аденокарциномы G1-G2 без регионарных и отдаленных метастазов, лимфоваскулярной и сосудистой инвазии, преимущественно без перинеуральной инвазии и неопьювантного лечения на дооперационном этапе. Тем не менее выявлены существенные различия в уровне экспрессии маркеров в разных зонах опухоли. За исключением  $\alpha$ SMA, в интактной слизистой оболочке исследуемые маркеры (POD, FAP, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ ) не экспрессировались. Реакция  $\alpha$ SMA наблюдалась в мышечной пластинке слизистой оболочки, а также

в крипальных фибробластах, формируя окантовку каждой крипты (рис. 2, а).

В ходе многофакторного дисперсионного анализа установлено, что уровень экспрессии маркера  $\alpha$ SMA в каждой из трех зон достоверно различался (рис. 3) (уровень значимости  $p=0,0081$ ), а именно: уровень экспрессии  $\alpha$ SMA был значимо выше в инвазивном крае и центральной части по сравнению с апикальной.

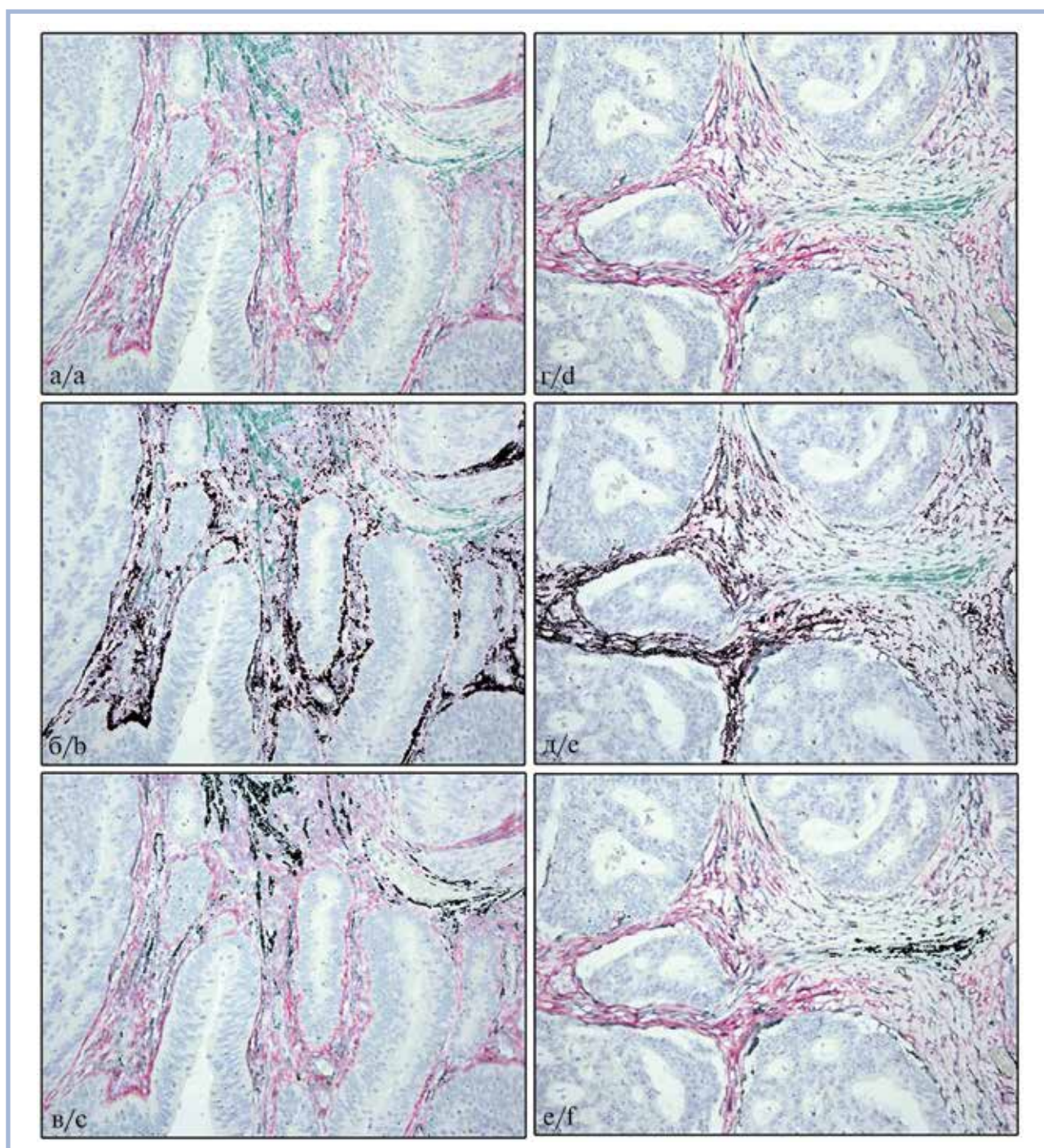
При анализе уровня экспрессии маркера POD в каждой из трех зон методом многофакторного дисперсионного анализа достоверных различий не обнаружено (уровень значимости  $p=0,2018$ ). Однако при применении непараметрического аналога этого метода (критерия Краскала—Уоллиса) установлены значимые различия в уровне экспрессии маркера POD в каждой из трех зон (уровень значимости  $p=0,0138$ ). При этом по сравнению с  $\alpha$ SMA уровень экспрессии POD демонстрирует противоположную тенденцию: в апикальной части (рис. 2, б) он выше, чем в центральной и инвазивном крае. Значения остальных маркеров значимо не отличались в разных зонах опухоли.

Установленные различия в уровне экспрессии каждого маркера в разных зонах свидетельствуют о выраженной гетерогенности. Отсутствие общей закономерности в распределении всех маркеров, описываемых как маркеры CAF, свидетельствует о потенциально разных выявляемых субпопуляциях клеток, с одной стороны, и о невозможности выявить все CAF с помощью одного маркера, — с другой. Несомненно, открытым остается вопрос о принадлежности всех этих маркеров к CAF. Несмотря на то что в исследовании выбирали поля зрения с минимальными «лишними» элементами, а воспалительный инфильтрат, мышечные элементы стенки кишки и сосуды не включали в оцениваемую площадь, полностью исключить все не относящиеся к CAF элементы невозможно. Мы полагаем, что повышенный уровень POD в апикальной части может быть связан с увеличенным количеством молодых сосудов и фибробластов, являющихся основой грануляционной ткани (рис. 2, в) в части опухоли, окружающей язвенный дефект, который наблюдался в 90,5% случаев выборки. Однако вследствие малого объема выборки статистически это предположение не подтвердилось.

Противоположная картина наблюдалась с  $\alpha$ SMA, максимальная экспрессия которого выявлялась в инвазивном крае и центральной зоне. Инвазивным краем считалось место непосредственной инвазии в клетчатку (где по последним рекомендациям следует подсчитывать количество «опухолевых почек» (tumor budding) [9]). В этой зоне нет грануляционной ткани, избытка сосудов, которые могли бы стать причиной ложных высоких показателей, а воспалительный инфильтрат, наблюдаемый в немногочисленных случаях, не экспрессирует  $\alpha$ SMA. В связи с этим полученные данные представляются корректными.

При сравнении значений маркеров между собой (рис. 4) обращают внимание более высокие показатели PDGFR $\beta$  и  $\alpha$ SMA и низкие показатели PDGFR $\alpha$  в центральной и инвазивной зонах. Отмечен высокий уровень экспрессии PDGFR $\beta$  во всех зонах большинства наблюдений. Считается, что экспрессия PDGFR $\beta$  в строме опухоли толстой кишки может быть ассоциирована с метастатическим потенциалом [10] и низкой дифференцировкой опухоли в плоскоклеточных опухолях пищевода [11].

Корреляционный анализ с целью поиска связи между экспрессией маркеров (колокализация) в каждой из зон обнаружил сильную обратную связь между уровнем  $\alpha$ SMA и FAP



**Рис. 1.** Иммуногистохимические реакции с антителами к PDGFR $\beta$  (красный) и  $\alpha$ SMA (зеленый), дуплексная метка на одном срезе,  $\times 20$ .

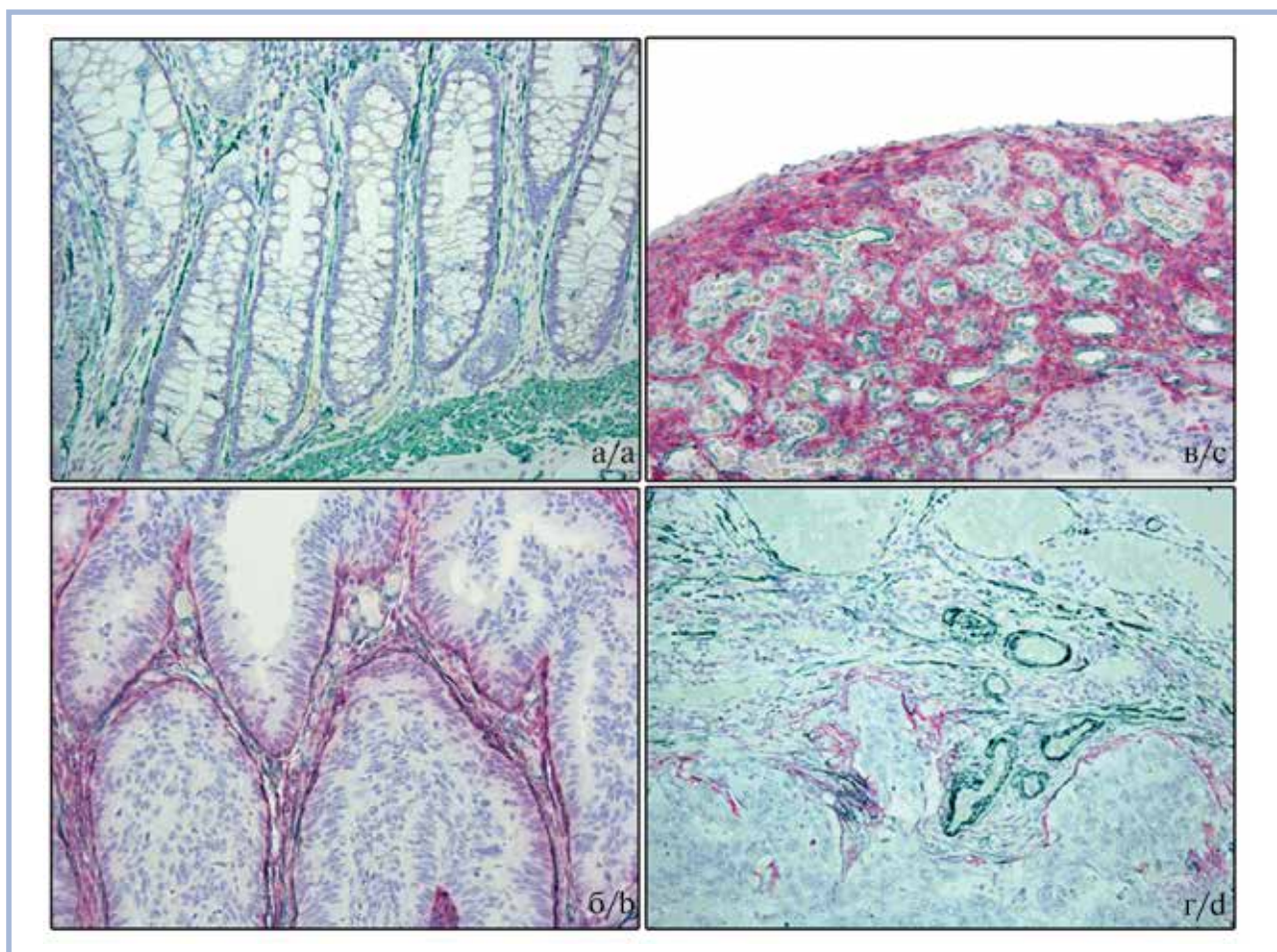
а, б, в — апикальная часть опухоли; г, д, е — инвазивный край опухоли; б, в, д, е — выделение (черный) каждого из цветов методом цветоделения с помощью программного средства LASX с последующим подсчетом площади метки: б — 6,029% PDGFR $\beta$ ; в — 1,708%  $\alpha$ SMA; д — 5,782% PDGFR $\beta$ ; е — 0,722%  $\alpha$ SMA.

**Fig. 1.** Immunohistochemical reactions with antibodies to PDGFR $\beta$  (red) and  $\alpha$ SMA (green), a duplex mark on one slice,  $\times 20$ .

a, b, c — apical part of the tumor; d, e, f — invasive edge of the tumor. b, c, e, f — selection (black) of each color by color separation using the LASX software tool, followed by calculating the label area: b — 6,029% PDGFR $\beta$ ; c — 1,708%  $\alpha$ SMA; e — 5,782% PDGFR $\beta$ ; f — 0,722%  $\alpha$ SMA.

в центральной зоне ( $r=0,79$ ,  $p=0,034$ ). Этот факт свидетельствует о разном биологическом значении FAP и  $\alpha$ SMA в отношении CAF и о том, что эти маркеры могут быть использованы для выявления разных субпопуляций CAF. Известно, что

FAP также экспрессируется мезенхимальными стволовыми клетками (MSC) в различных локализациях. Кроме того, FAP выделен методом ПЦР из условно интактной стромы, прилегающей к опухоли (карцинома пищевода, легкого и глиома),

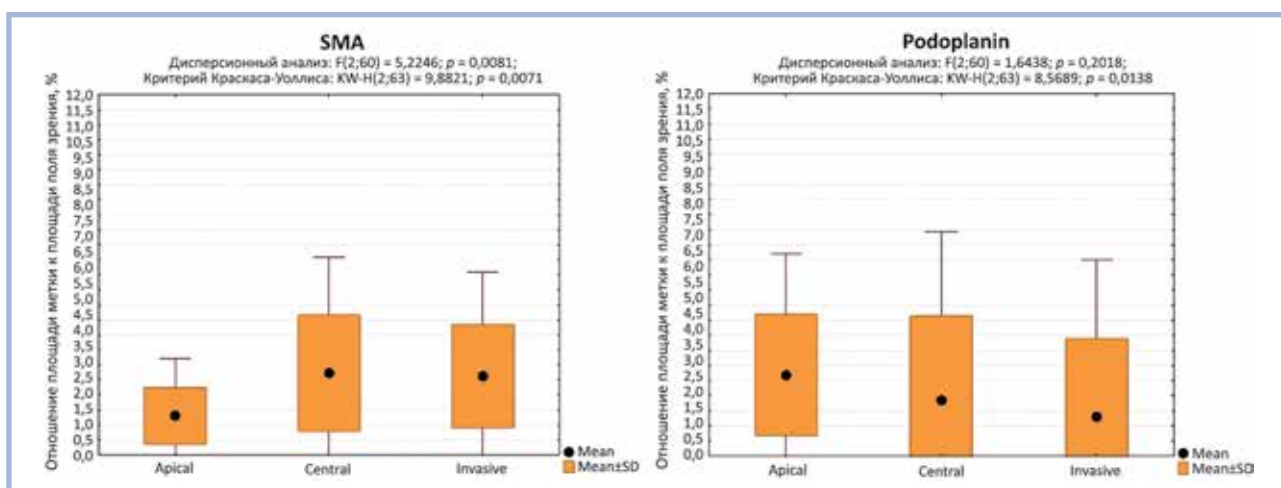


**Рис. 2.** Иммуногистохимические реакции, ×20.

а — реакция с антителами к αSMA в интактной слизистой оболочке, вторая метка отсутствует; б — реакция с POD (красный) и αSMA (зеленый) в апикальной части опухоли; в — реакция с POD (красный) и αSMA (зеленый) в грануляционной ткани (внутренний край изъязвления опухоли); г — реакция с FAP (красный) и αSMA (зеленый) в инвазивном крае опухоли.

**Fig. 2.** Immunohistochemical reactions, ×20.

а — reaction with antibodies to αSMA in the intact mucosa, the second label is missing; б — reaction with POD (red) and αSMA (green) in the apical part of the tumor; в — reaction with POD (red) and αSMA (green) in the granulation tissue (inner edge of the tumor ulceration); г — reaction with FAP (red) and αSMA (green) in the invasive edge of the tumor.



**Рис. 3.** Средние значения αSMA и POD в трех различных зонах со стандартными отклонениями.

**Fig. 3.** Average values of the αSMA and POD in three different zones with standard deviations.



**Рис. 4.** Средние значения отношения площади метки к площади поля зрения для каждого маркера в различных зонах аденокарциномы толстой кишки.

**Fig. 4.** Average values of the ratio the mark's area to the the field of vision's area for each marker in different zones of colon adenocarcinoma.

в то время как в интактных тканях, расположенных на отдалении от опухоли, FAP не обнаружен [12, 13].

Также выявлены две сильные тенденции прямых взаимосвязей в центральной зоне в парах переменных  $\alpha$ SMA/PDGFR $\alpha$  и POD/PDGFR $\alpha$  ( $p=0,06$  и  $p=0,07$  соответственно) и слабая тенденция в паре переменных PDGFR $\beta$ /PDGFR $\alpha$  ( $r=0,62$ ,  $p=0,054$ ). Есть данные о связи высокого уровня PDGFR $\alpha$  с хорошим прогнозом, а PDGFR $\beta$  с плохим во многих солидных опухолях, что некоторые авторы интерпретируют как принадлежность PDGFR $\alpha$  к сдерживающей популяции CAF [14]. Полученные данные не противоречат этой концепции: если принять PDGFR $\alpha$  в качестве хорошего прогностического фактора, то прямые взаимосвязи с POD и  $\alpha$ SMA косвенно свидетельствуют и об их благоприятном прогностическом значении. В рамках этих рассуждений обратная взаимосвязь  $\alpha$ SMA/FAP представляет FAP как неблагоприятный прогностический фактор, что сочетается с данными мировой литературы, поскольку есть сведения о связи высокого уровня экспрессии FAP с регионарным метастазированием, низкой общей выживаемостью, высокой степенью злокачественности для карцином различной локализации, в том числе колоректального рака [15]. Таким образом, полученные корреляции и данные о колокализации маркеров кажутся логичными, хотя нельзя исключать определенной погрешности в связи с малой выборкой ( $n=21$ ).

В ходе анализа изображений помимо площади метки обратили внимание на расположение каждого из пары маркеров относительно опухолевых комплексов. Обнаружено, что в разных случаях внутренний (ближайший к опухолевому комплексу) слой отличался. Так, в одной карциноме (1-й случай) ближайшим оказался зеленый слой ( $\alpha$ SMA) по сравнению с POD и PDGFR (рис. 5, а, г). В другой опухоли (2-й случай) ближайшим оказался красный слой (рис. 5, б, д) (POD и PDGFR $\beta$  соответственно). Мнение о том, что распределение маркеров зависит от конкретной опухоли, оказалось ложным, так как в рамках каждого из приведенных случаев обнаружена смешанная экспрессия: для ряда маркеров ближайший к эпителиальным комплексам контур был представлен как зеленой, так и красной меткой. Такая ситуация продемонстрирована для пары POD/ $\alpha$ SMA в n2 (рис. 5, в) и пары FAP/ $\alpha$ SMA в n1 (рис. 5, е). Продемонстрированные различия кажутся чрезвычайно интересны-

ми, поскольку, возможно, именно ближайший слой фибробластов оказывает большее влияние на эпителиальные структуры, обуславливая поведение и развитие опухоли. Перспективным может оказаться поиск корреляций между прогностическими клиничко-морфологическими характеристиками и внутренним слоем фибробластов.

Настоящая работа основана на сравнении исследуемых маркеров с  $\alpha$ SMA как наиболее общепризнанного маркера CAF. Однако наличие  $\alpha$ SMA также в сосудах, мышечной ткани и, возможно, в ряде мезенхимальных элементов затрудняет идентификацию именно CAF, в связи с чем оценка внутреннего слоя в сравнении с  $\alpha$ SMA может оказаться некорректной. Другой проблемой является гетерогенность распределения даже в пределах одного случая, как в нашем 2-м примере (см. рис. 5, б, в), когда в одной опухоли конкретный маркер (POD) является и внутренним и внешним слоем одновременно в разных полях зрения. И третьей основной проблемой является непосредственная оценка внутреннего слоя (см. рис. 5, е) при смешанной экспрессии, когда часть контура представлена зеленой меткой ( $\alpha$ SMA), а часть — красной. Возможно, при рассмотрении большего количества маркеров на одном срезе, распределение окажется еще более мозаичным и сложным.

## Заключение

Проведены идентификация и оценка уровня CAF с помощью пяти маркеров:  $\alpha$ SMA, FAP, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  и POD. Несмотря на выраженную гетерогенность распределения маркеров в зависимости от зоны опухоли, удалось установить более высокий уровень экспрессии POD в апикальной части и  $\alpha$ SMA в инвазивном крае. В большинстве случаев во всех зонах отмечался достоверно не различающийся высокий уровень экспрессии PDGFR $\beta$ . Впервые получены статистически значимые данные о колокализации  $\alpha$ SMA/FAP,  $\alpha$ SMA/PDGFR $\alpha$  и POD/PDGFR $\alpha$  в колоректальном раке, а также отмечены статистически значимые данные о колокализации  $\alpha$ SMA/FAP,  $\alpha$ SMA/PDGFR $\alpha$  и POD/PDGFR $\alpha$  в колоректальном раке. Выявленные впервые различия в расположении маркеров относительно опухолевых (эпителиальных) комплексов стали возможны благодаря идентификации CAF с помощью технологии дуплексной метки на одном срезе. Полученные данные побуждают к проведению дополнительных исследований CAF и их особенностей на большем объеме материала с целью лучшего понимания молекулярно-биологических характеристик колоректального рака.

## Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Н.А. Олейникова  
Сбор и обработка материала — Н.А. Олейникова, О.А. Харлова

Статистическая обработка данных — И.А. Михайлов

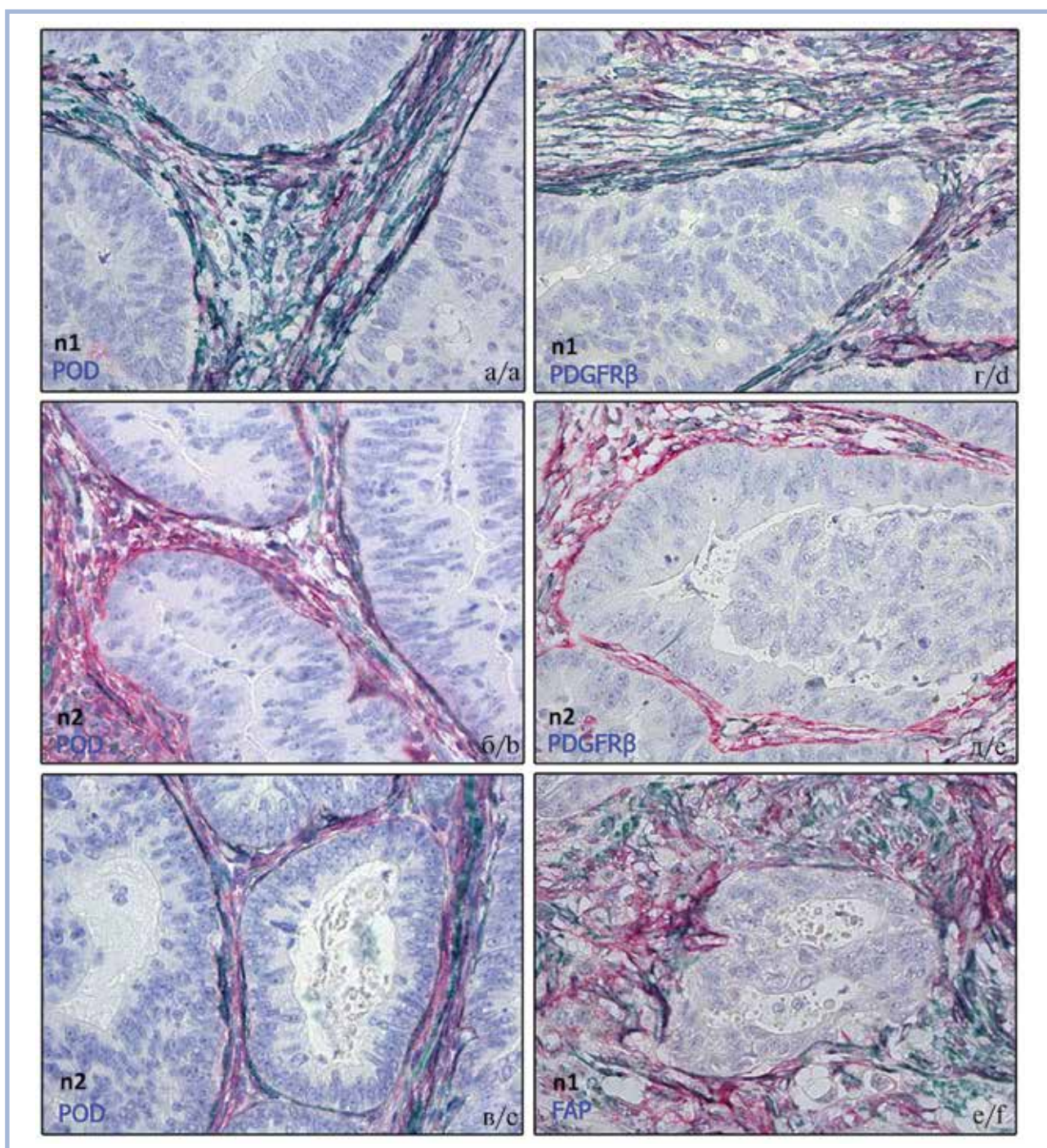
Написание текста — Н.А. Олейникова

Редактирование — Н.В. Данилова, П. Г. Мальков

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, грант «Перспектива» №19-315-60006) и с использованием оборудования, приобретенного по программе развития МГУ им. М.В. Ломоносова до 2020 г.*

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

**The authors declare no conflicts of interest.**



**Рис. 5.** Различия в расположении реакции маркеров CAF относительно опухолевых комплексов на примере двух случаев (n1 и n2).

а, б, в — реакция с POD (красный) и  $\alpha$ SMA (зеленый); г, д — реакция с PDGFR $\beta$  (красный) и  $\alpha$ SMA(зеленый); е — реакция с FAP (красный) и  $\alpha$ SMA (зеленый),  $\times 40$ .

**Fig. 5.** Differences in the location of the CAF marker reaction relative to tumor complexes in two cases (n1 and n2).

а, b, с — reaction with POD (red) and  $\alpha$ SMA (green); d, e — reaction with PDGFR $\beta$  (red) and  $\alpha$ SMA (green); f — reaction with FAP (red) and  $\alpha$ SMA (green),  $\times 40$ .

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):582-598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.
2. Lujambio A, Akkari L, Simon J, Grace D, Tschaharganeh DF, Bolden JE, Zhao Z, Thapar V, Joyce JA, Krizhanovsky V, Lowe

- SW. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell*. 2013; 153(2):449-460.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.020>.
3. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Wever O. Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol*. 2015;5:63.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00063>
  4. Berdiel-Acer M, Sanz-Pamplona R, Calon A, Cuadras D, Berenguer A, Sanjuan X, Paules MJ, Salazar R, Moreno V, Batlle E, Villanueva A, Mollevi DG. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol*. 2014;8(7):1290-1305.  
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.04.006>.
  5. Darby IA, Laverdet B, Bonte F, Desmouliere A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014;7:301-311.  
<https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>.
  6. Cortez E, Roswall P, Pietras K. Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2014;25:3-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.010>.
  7. Dumont N, Liu B, Defilippis RA, Chang H, Rabban JT, Karnezis AN, Tjoe JA, Marx J, Parvin B, Tlsty TD. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia*. 2013;15(3):249-262.  
<https://doi.org/10.1593/neo.121950>.
  8. Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;99(Pt B):186-196.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.07.007>.
  9. WHO classification of tumours. Digestive system tumours. 5<sup>th</sup> ed. WHO Press; 2019.
  10. Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Hamilton SR, Filder IJ. Expression of activated platelet-derived growth factor receptor in stromal cells of human colon carcinomas is associated with metastatic potential. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2567-2574.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.22229>
  11. Ha SY, Yeo SY, Xuan YH, Kim SH. The prognostic significance of cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(6):e99955.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099955>
  12. Krepela E, Busek P, Hilsner M, Vanickova Z, Sedo A. Species-specific real-time RT-PCR analysis of expression of stromal cell genes in a tumor xenotransplantation model in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(1):126-133.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.061>
  13. Tyulkina DV, Pleshkan VV, Alekseenko IV, Kopantseva MR, Sverdlov ED. Expression of the FAP gene in non-fibroblast human cell lines. Development of cancer-associated fibroblast models. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;470(1):319-321.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672916050033>.
  14. Kilvaer TK, Rakaee M, Hellevik T, Vik J, Petris L, Donnem T, et al. Differential prognostic impact of platelet-derived growth factor receptor expression in NSCLC. *Sci Rep*. 2019;9(1):10163.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46510-3>
  15. Pure E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. *Oncogene*. 2018;37(32):4343-4357.  
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0275-3>

Поступила 18.05.2020

Received 18.05.2020

Принята в печать 25.05.2020

Accepted 25.05.2020