

Исследование статуса киназы анапластической лимфомы при рабдомиосарcomaх: корреляция с клинико-патологическими данными

Д.Ш. Полатова¹, Г.К. Ботиралиева², Д.М. Коновалов³, Б.Х. Бабанов², А.С. Шарлай³, А.Н. Муратов², С.А. Хайитбоев², М.А. Жахонгирова⁴, А.В. Савкин¹, Н.К. Асамединов¹, А.И. Нуржабов¹

¹Ташкентский государственный стоматологический институт; Республика Узбекистан, 100047 Ташкент, ул. Махтумкули, 103;

²ООО "Ipsum pathology"; Республика Узбекистан, 100058 Ташкент, ул. Богистон, 1;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

⁴Ташкентская медицинская академия; Республика Узбекистан, 100109 Ташкент, ул. Фароби, 2

Контакты: Гулрух Камилжановна Ботиралиева gulrukhbotiraliyeva@gmail.com

Введение. Рабдомиосаркома (РМС) – опухоль высокой степени злокачественности, встречающаяся в основном у детей. Несмотря на то, что мультимодальная терапия является многообещающей, у пациентов с высоким риском (по стратификационной шкале) наблюдаются низкие показатели выживаемости. Возникает потребность в изучении новых возможностей лечения данной категории больных. На сегодняшний день большой интерес вызывают ингибиторы киназы анапластической лимфомы (anaplastic lymphoma kinase, ALK).

Цель исследования – изучение экспрессии ALK в тканях РМС как потенциального таргетного маркера.

Материалы и методы. Изучены 202 гистологических блока РМС. Экспрессия ALK качественно оценивалась иммуногистохимическим методом, также определялась ее корреляция с гистологическим подтипом опухоли и клиническими данными пациентов.

Результаты. Экспрессия ALK в образцах альвеолярной РМС наблюдалась в 68 % (41/60) случаев, эмбриональной – в 30 % (26/87), веретенноклеточной/склерозирующей – в 7 % (1/14), эпителиоидной (ЭпРМС) – в 100 % (2/2). Исследование показало корреляцию экспрессии ALK с альвеолярным типом РМС ($p < 0,05$). Во всех случаях альвеолярной РМС с фокальной экспрессией ALK D5F3 наблюдался преимущественно низкий или умеренный уровень активности против анти-миогенина и MyoD1. Реже ALK-положительные образцы встречались в группе эмбриональной и веретенноклеточной/склерозирующей РМС.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ALK является многообещающей мишенью для лечения пациентов с РМС. Планируется дальнейшее изучение дополнительных генетических aberrаций ALK, которое, возможно, послужит трамплином для обоснования применения таргетной терапии.

Ключевые слова: рабдомиосаркома, экспрессия киназы анапластической лимфомы, ALK, иммуногистохимическое исследование

Для цитирования: Полатова Д.Ш., Ботиралиева Г.К., Коновалов Д.М. и др. Исследование статуса киназы анапластической лимфомы при рабдомиосарcomaх: корреляция с клинико-патологическими данными. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2022;14(4):54–62. DOI: 10.17650/2782-3687-2022-14-4-54-62

ANALYSIS OF ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE STATUS IN RHABDOMYOSARCOMAS: CORRELATION WITH CLINICOPATHOLOGICAL FINDINGS

D.Sh. Polatova¹, G.K. Botiraliyeva², D.M. Konovalov³, B.X. Babanov², A.S. Sharlay³, A.N. Muratov², S.A. Khayitboev², M.A. Zhakhongirova⁴, A.V. Savkin¹, N.K. Asamedinov¹, A.I. Nurzhabov¹

¹Tashkent State Dental Institute; Republic of Uzbekistan, 103 Makhtumkuli St., Tashkent 100047, Republic of Uzbekistan;

²LLC "Ipsum pathology"; 1 Bogiston St., Tashkent 100058, Republic of Uzbekistan;

³Dmitry Rogachev National Medical Research center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samora Mashela St., Moscow 117997, Moscow, Russia;

⁴Tashkent Medical Academy; 2 Farobi St., Tashkent 100109, Republic of Uzbekistan

Contacts: Gulrukh Kamilzhanovna Botiraliyeva gulrukhbotiraliyeva@gmail.com

Introduction. Rhabdomyosarcoma (RMS) is a highly malignant tumor occurring mostly in children. Multimodal therapy is currently promising, however, in patients with high risk (per the stratification scale) low survival rates are observed. There remains a necessity for new possibilities in treatment of this category of patients. Currently, anaplastic lymphoma kinase (ALK) is of considerable interest.

Aim. To study expression of ALK as a potential target marker in RMS tissues.

Materials and methods. In total, 202 histological RMS blocks were studied. ALK expression was qualitatively measured using immunohistochemistry, and its correlation with histological tumors subtype and patient's clinical data was evaluated.

Results. ALK expression in samples of alveolar RMS was observed in 68 % (41/60) of cases, samples of embryonal RMS in 30 % (26/87) cases, samples of spindle cell/sclerosing RMS in 7 % (1/14) of cases, samples of epithelioid RMS (EpiRMS) in 100 % (2/2) of cases. The study showed correlation between ALK expression and alveolar RMS subtype ($p < 0.05$). In all cases of alveolar RMS with focal ALK D5F3 expression, primarily low or moderate activity levels against anti-myogenin and MyoD1 were observed. ALK-positive samples in the embryonal and spindle cell/sclerosing RMS samples were rarer.

Conclusion. The results show that ALK is a promising target for treatment of patients with RMS. Further study of additional genetic aberrations of ALK is planned which could serve as a springboard for development of targeted therapy.

Keywords: rhabdomyosarcoma, anaplastic lymphoma kinase expression, ALK, immunohistochemistry

For citation: Polatova D.Sh., Botiralieva G.K., Konovalov D.M. et al. Analysis of anaplastic lymphoma kinase status in rhabdomyosarcomas: correlation with clinicopathological findings. *Sarkomy kostej, myagkikh tkanej i opukholi kozhi = Bone and soft tissue sarcomas, tumors of the skin* 2022;14(4):54–62. (In Russ.). DOI: 10.17650/2782-3687-2022-14-4-54-62

Введение

Рабдомиосаркома (РМС) — опухоль высокой степени злокачественности, развивающаяся из предшественников мезенхимальной ткани, участвующих в дифференциации скелетных мышц. Данное новообразование составляет 40 % мягкотканых опухолей, возникающих в детском возрасте, и встречается в 4,5 случая на 1 млн человек в год [1].

По классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в зависимости от морфологических и прогностических свойств РМС подразделяют на эмбриональную (ЭРМС), альвеолярную (АРМС), плеоморфную (ПРМС) и веретенноклеточную/склерозирующую (ВРМС). Также отмечается эпителиоидный вариант РМС, который еще не вошел в классификацию ВОЗ, но описан и определяется как отдельная нозологическая форма РМС [2]. Наиболее агрессивным типом, имеющим неблагоприятный прогноз, является АРМС. Эта опухоль характеризуется специфической хромосомной $t(2,13)$ или $t(1,13)$ транслокацией, в результате чего образуются химерные транскрипты *PAX3-FOXO1* или *PAX7-FOXO1*. Эмбриональная РМС обычно не имеет специфической транслокации, за исключением потери гетерозиготности на локусе 11p15, и характеризуется благоприятным течением, сходным с течением АРМС, при которой наблюдается транскрипция *PAX3-FOXO1* [3, 4].

Несмотря на то, что стандартная агрессивная химиотерапия с применением режима VAC (винкристин, актиномицин-D, циклофосфамид) и лучевая терапия дают хорошие результаты, у пациентов с высоким риском прогрессирования заболевания наблюдаются низкие показатели выживаемости (5-летняя

выживаемость составляет 30 %) по сравнению с больными диссеминированными формами других типов опухолей мягких тканей [5–7]. В связи с этим возникает потребность в поиске новых терапевтических опций.

На сегодняшний день определение потенциальных молекулярных таргетов для лечения злокачественных опухолей является приоритетным направлением исследований. Их определение позволит не только повысить эффективность терапии, но и снизить токсичность химиотерапии и лучевой терапии.

Киназа анапластической лимфомы (anaplastic lymphoma kinase, ALK) представляет собой трансмембранный рецептор, тирозинкиназу, относящуюся к суперсемейству инсулиновых рецепторов. Ген *ALK* может проявлять онкогенное действие в результате реаранжировки с соседними генами. Такого рода альтерации наблюдаются при анапластической крупноклеточной лимфоме, ALK-положительной В-клеточной лимфоме, воспалительной миофибробластной опухоли, а также при некоторых карциномах легкого и почки, нейробластомах и опухолях щитовидной железы [8–15].

Клиническая значимость альтераций в гене *ALK* продемонстрирована несколькими клиническими исследованиями. Ингибитор ALK — кризотиниб — характеризуется выраженным ответом и хорошими показателями контроля над заболеванием у пациентов с транслокацией в гене *ALK*, например при немелкоклеточном раке легкого [16].

С учетом важности дальнейшей возможности проведения таргетной терапии в случаях *ALK*-мутации у больных рабдомиосаркомой, **цель** данного **исследования** — анализ экспрессии ALK в опухолевой ткани и

выявление ассоциации гистологического строения опухоли с клиническими данными пациентов.

Материалы и методы

Были отобраны гистологические образцы 202 пациентов, у которых за период с 2013 по 2020 г. верифицирован диагноз «рабдомиосаркома». Клинические данные были получены из архивных сопроводительных документов. В отобранных случаях отмечались положительная реакция на десмин и миорегуляторные протеины — миогенин и myoD1 (на один или оба).

Для проведения рутинной окраски гематоксилином и эозином и иммуногистохимического (ИГХ) исследования применяли методику создания тканевых матриц (tissue microarrays, TMA) [17]. Для изготовления TMA предварительно были созданы табличные карты поверхности матрицы в двухмерной системе координат ($x - y$), в которых каждому исследовательскому и контрольному образцу был присвоен порядковый номер, состоящий из буквы (ряд) и цифры (столбец) (рис. 1). Помимо этого, дополнительно с использованием MS Excel 2016 (Microsoft, США) сформирована электронная база данных для всех TMA, в которой отражались сведения о каждом опухолевом образце и необходимая информация о пациенте.

Техническую часть исследования осуществляли с помощью автоматизированной системы для создания TMA на блоках-реципиентах EverBio AutoTiss 10C (EverBio Technology Inc., Тайвань). Диаметр используемого панчера (core) составил 2 мм, расстояние между тканевыми образцами — 1 мм.

По каждой TMA с помощью ротационного микро-тома Leica RM 2245 (Leica, Германия) изготовлены серии микросрезов толщиной 3–4 мкм, которые были

помещены на высокоадгезивные предметные стекла (SuperFrost). Первый срез окрашивали гематоксилином и эозином, остальные срезы использовали для проведения ИГХ-исследований.

Для окраски срезов гематоксилином и эозином стекла предварительно помещали в дистиллированную воду, после чего выдерживали в течение 2–5 мин в растворе гематоксилина Эрлиха. Срезы промывали дистиллированной водой. Контроль окраски осуществляли под микроскопом. Окрашивание считалось удовлетворительным, если ядра имели интенсивный красно-фиолетовый цвет, внутри ядер визуализировались ядрышки и глыбки хроматина, а цитоплазма при этом не окрашивалась. Затем срезы промывали подщелоченной водой до их посинения (20–30 с). Окрашенные гематоксилином и промытые водой срезы помещали в дистиллированную воду на 3–5 мин. Для окраски цитоплазмы клеток срезы погружали на 0,5–2 мин в раствор эозина. Процедура считалась успешной, если срез имел равномерный желтовато-розовый цвет, на фоне которого отчетливо визуализировались окрашенные в синий цвет ядра. После окраски в растворе эозина срезы промывали дистиллированной водой, обезжировали спиртом, просветляли в ксилоле и заключали в консервирующую среду.

Депарафинирование и регидратация материала, демаскировка антигена, а также непосредственно ИГХ-реакции с антителом ALK (D5F3 и p80) проводили в автоматизированном режиме с применением автостейнера Ventana BenchMark Ultra (Ventana Medical Systems, США). Детекцию выполняли с помощью DAB-хромогена в составе ultraView Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems, США) с последующей окраской гематоксилином.

После завершения автоматизированного этапа срезы заключали в консервирующую среду (под покровное стекло). Готовые препараты исследовали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse 80i (Nikon, Япония), для оцифровки гистологических стекол использовали микроскоп, сканирующий Aperio ScanScope (Leica Microsystems, США).

Результаты ИГХ-реакции для ALK, клонов D5F3 и p80 показывали характер экспрессии: диффузный или фокальный.

Результаты

Диагноз «рабдомиосаркома» верифицирован у 88 (44 %) пациентов женского пола и у 114 (56 %) — мужского пола (соотношение женщин и мужчин 1 : 1,3) в возрасте от 16 дней до 44 лет (медиана возраста 5,6 года).

В группу исследования вошли 10 детей в возрасте до 1 года, 190 детей — от 1 года до 18 лет и 2 взрослых пациента (32 и 44 года) (рис. 2). Клинико-патологическая характеристика больных РМС представлена в табл. 1.

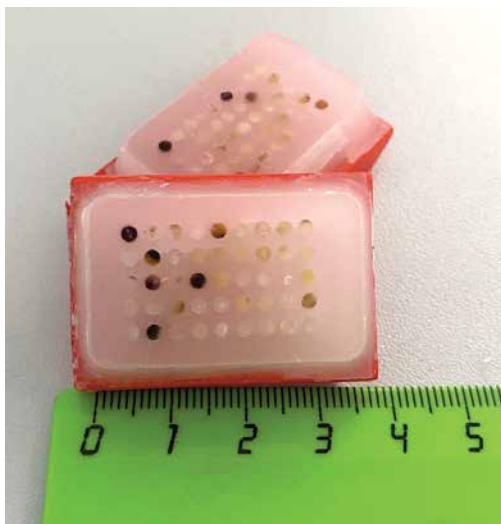


Рис. 1. Готовые блоки тканевых матриц
Fig. 1. Prepared blocks of tissue matrices

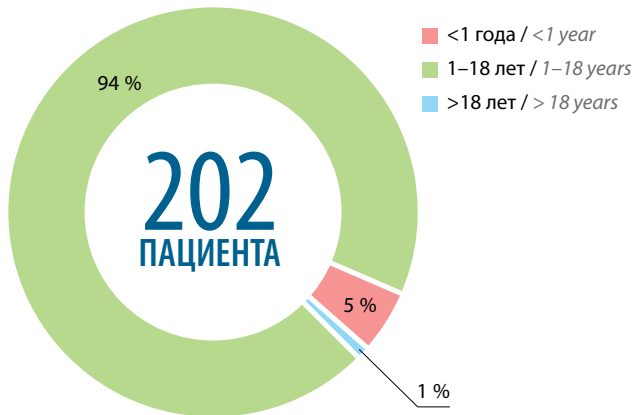


Рис. 2. Возрастное соотношение пациентов исследуемой группы
Fig. 2. Age distribution in patients of the studied group

Наиболее часто первичная опухоль локализовалась в области головы и шеи (у 69 пациентов), урогенитальном тракте (у 44 пациентов), мягких тканях нижних и верхних конечностей (у 22 и 16 пациентов соответственно). Другие анатомические области — туловище, грудная клетка, брюшная полость, забрюшинное пространство и таз — были вовлечены реже. В 7 случаях опухоль затрагивала несколько анатомических областей, в 11 — ее локализация была неизвестна.

Эмбриональная РМС диагностирована в 118 случаях, АРМС — в 65, ВРМС — в 16, эпителиоидная РМС (ЭпРМС) — в 2. У 1 пациента вследствие недостаточного количества гистологического материала не удалось точно верифицировать вариант РМС, в связи с чем опухоль классифицирована как РМС без дополнительных уточнений.

Наиболее частыми локализациями ЭРМС были урогенитальный тракт (31 % случаев) и область головы и шеи (39 % случаев). У 25 % пациентов АРМС располагалась в области головы и шеи, у 17 — в верхних конечностях, у 20 — в нижних конечностях. Для ВРМС характерными локализациями оказались область головы и шеи (31 % случаев), верхние конечности (19 % случаев) и урогенитальный тракт (19 % случаев). У 1 пациента ЭпРМС располагалась в области головы и шеи, еще у 1 больного наблюдалось вовлечение в патологический процесс нескольких анатомических областей. Локализация РМС представлена в табл. 1.

С гистологической точки зрения группа ЭРМС в данном исследовании оказалась довольно мономорфной (рис. 3). Все образцы характеризовались наличием примитивных мезенхимальных клеток (от звездчатых с амфифильной цитоплазмой до удлинённых с яркой эозинофильной цитоплазмой), количество рабдомиобластов варьировало внутри группы. В некоторых случаях наблюдались признаки терминальной дифференцировки в виде многоядерных клеток с поперечной

Таблица 1. Клинико-патологическая характеристика пациентов с рабдомиосаркомой (РМС)

Table 1. Clinical and pathological characteristics of patients with rhabdomyosarcoma (RMS)

Характеристика Characteristic	Число пациентов, абс. Number of patients, abs.
Возраст, лет: Age, years:	
<1	10
1–18	190
>18	2
Пол: Sex:	
мужской male	114
женский female	88
Локализация опухоли: Tumor locations:	
область головы и шеи head and neck	69
верхняя конечность upper limb	16
нижняя конечность lower limb	22
туловище trunk	3
грудная клетка thoracic cage	3
забрюшинное пространство retroperitoneal space	7
область таза pelvis	8
урогенитальный тракт urogenital tract	44
брюшная полость abdominal cavity	12
несколько анатомических областей several anatomical regions	7
локализация неизвестна unknown location	11
Вариант РМС: RMS variant:	
ЭРМС ERMS	118
АРМС ARMS	65
ВРМС SRMS	16
ЭпРМС EpiRMS	2
БДУ NS	1

Примечание. ЭРМС — эмбриональная РМС; АРМС — альвеолярная РМС; ВРМС — веретенноклеточная/склерозирующая РМС; ЭпРМС — эпителиоидная РМС; БДУ — без дополнительных уточнений.

Note. ERMS — embryonic RMS; ARMS — alveolar RMS; SRMS — spindle cell/sclerosing RMS; EpiRMS — epithelioid RMS; NS — not specified.

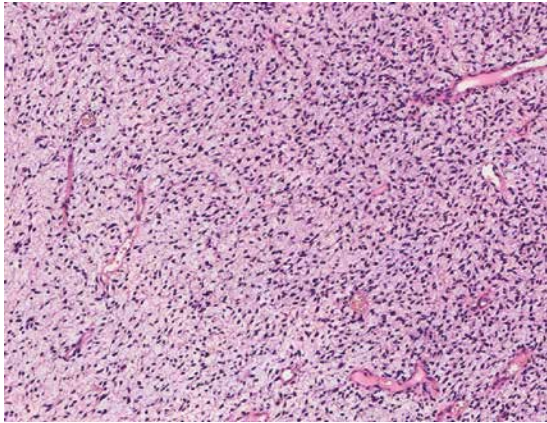


Рис. 3. Эмбриональная рабдомиосаркома. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. Ткань опухоли представлена примитивными мезенхимальными клетками, находящимися на разных стадиях миогенеза. Клеточный состав опухоли варьирует от звездчатых клеток со скудной амфифильной цитоплазмой до продолговатых с цитоплазматической эозинофилией. Клетки располагаются посреди миксоидной стромы

Fig. 3. Embryonic rhabdomyosarcoma. Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$. Tumor tissue is represented by primitive mesenchymal cells at different stages of myogenesis. Tumor cell composition varies from stellate cells with scant amphiphilic cytoplasm to elongated cells with cytoplasmic eosinophilia. Cells are located inside myxoid stroma

исчерченностью. Содержание миксоидной стромы было разным: от незначительного до среднего уровня.

Группа АРМС представлена 2 гистологическими вариантами: солидным и альвеолярным, при этом преобладал 1-й вариант (рис. 4). По сравнению с ЭРМС группа АРМС характеризовалась высокой клеточ-

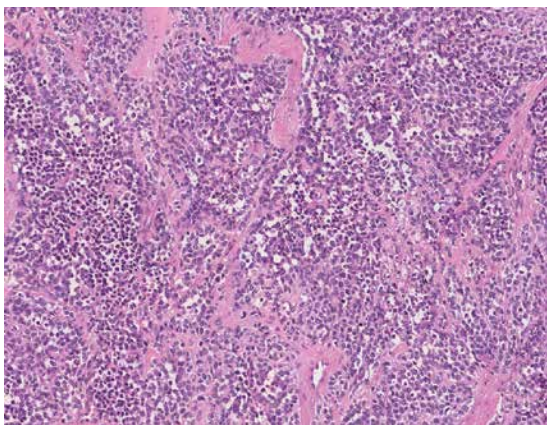


Рис. 4. Альвеолярная рабдомиосаркома. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. Неопластическая ткань представлена мономорфными округлыми клетками с гиперхромными округлыми ядрами, цитоплазма отграничена слабо. Клетки опухоли организованы в гнезда, разделенные фиброваскулярными септами

Fig. 4. Alveolar rhabdomyosarcoma. Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$. Neoplastic tissue with monomorphic round cells with hyperchromic round nuclei, cytoplasm is almost indiscernible. Tumor cells are organized into nests separated by fibrovascular septums

ностью и минимальной цитологической вариабельностью. Сольный вариант был представлен гиперклеточными пластами мономорфных круглых клеток, фиброваскулярная строма отсутствовала. Классический вариант строения АРМС — альвеолярный — характеризовался наличием большого количества фиброваскулярной стромы, формирующей септы, которые разделяли опухолевые клетки на гнезда, с формированием «частокола» вдоль фиброваскулярной перегородки.

Несмотря на немногочисленность группы ВРМС, в исследование вошли как образцы с веретеноклеточным, так и со склерозирующим строением. Веретеноклеточный вариант был представлен длинными пересекающимися пучками мономорфных веретеновидных клеток с удлинённым ядром, незначительной атипией и светлой нечеткой цитоплазмой. Морфология склерозирующей рабдомиосаркомы отличалась наличием ярко выраженной гиалинизации и склероза стромы, при этом опухолевые клетки имели тенденцию к формированию тяжей, гнезд и трабекул (рис. 5).

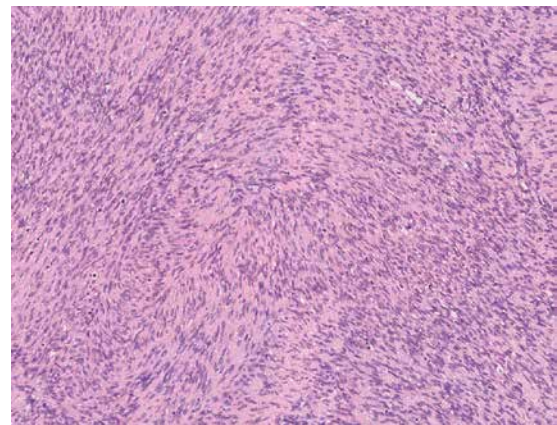


Рис. 5. Веретеноклеточная/склерозирующая рабдомиосаркома. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. Ткань опухоли представлена веретеновидными клетками, формирующими разнонаправленные пучки. Ядра клеток овоидной формы с тонкодисперсным хроматином и 1 крупным ядрышком, цитоплазма с четкими контурами, слабо эозинофильная

Fig. 5. Spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma. Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$. Tumor tissue is represented by spindle-like cells forming multidirectional bundles. Cell nuclei have ovoid shape with thin dispersed chromatin and 1 large nucleolus, cytoplasm with sharp outline, weakly eosinophilic

В нашем исследовании были всего 2 пациента с ЭПРМС в возрасте 32 и 44 лет. У них опухоль имела схожее гистологическое строение. Ткань состояла из эпителиоидных клеток одинакового размера с обильной амфифильной цитоплазмой, крупным везикулярным ядром с несколькими ядрышками (рис. 6). Отмечалось большое количество митозов с множеством атипичных форм. В обоих случаях в ткани присутствовали поля некроза.

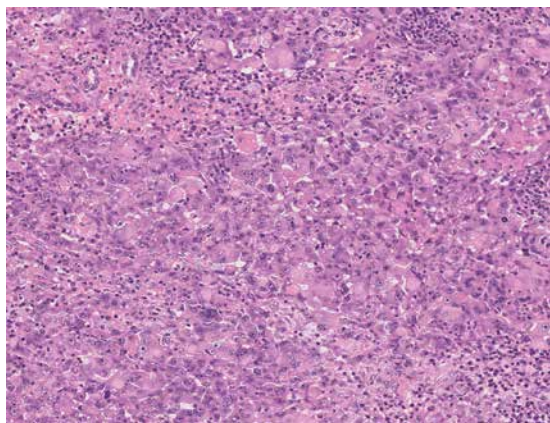


Рис. 6. Эпителиоидная рабдомиосаркома. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. Ткань опухоли состоит из полей и гнезд умеренно полиморфных клеток округлой или неправильной формы. Ядра округлой формы содержат крупноглыбчатый и вакуолизированный хроматин и 1–2 крупных ядрышка. Цитоплазма с четкими контурами, эозинофильная, в некоторых клетках эксцентричная. Обращает на себя внимание крайне высокая митотическая активность

Fig. 6. Epithelioid rhabdomyosarcoma. Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$. Tumor tissue consists of fields and nests of moderately polymorphic cells of round or irregular shape. Nuclei are round with coarse lumpy and vacuolized chromatin and 1–2 large nucleoli. Cytoplasm with sharp outline, eosinophilic, in some cases eccentric. High mitotic activity is notable

При ИГХ-исследовании экспрессии ALK (p80) по разным причинам были потеряны 6 % образцов АРМС и 16 % образцов ЭРМС. Все образцы ЭпРМС и ВРМС сохранились и были доступны для проведения исследования. Доля потери материала при исследовании экспрессии ALK (D5F3) для образцов АРМС составила 8 %, ЭРМС – 15 %, ВРМС – 12,5 %.

Таблица 2. Результаты иммуногистохимического исследования характера экспрессии киназы анапластической лимфомы (ALK) в ткани рабдомиосаркомы (РМС), n

Table 2. Results of immunohistochemical study of anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression in rhabdomyosarcoma tissue (RMS), n

Тип РМС RMS type	Количество образцов с фокальной/диффузной экспрессией ALK Number of samples with focal/diffuse ALK expression	
	Клон D5F3 D5F3 clone	Клон p80 p80 clone
ЭРМС ERMS	20/6	5/1
АРМС ARMS	16/25	3/4
ВРМС SRMS	1/0	0/0
ЭпРМС EpiRMS	0/2	0/2

Примечание. ЭРМС – эмбриональная РМС; АРМС – альвеолярная РМС; ВРМС – веретенноклеточная/склерозирующая РМС; ЭпРМС – эпителиоидная РМС.

Note. ERMS – embryonic RMS; ARMS – alveolar RMS; SRMS – spindle cell/sclerosing RMS; EpiRMS – epithelioid RMS.

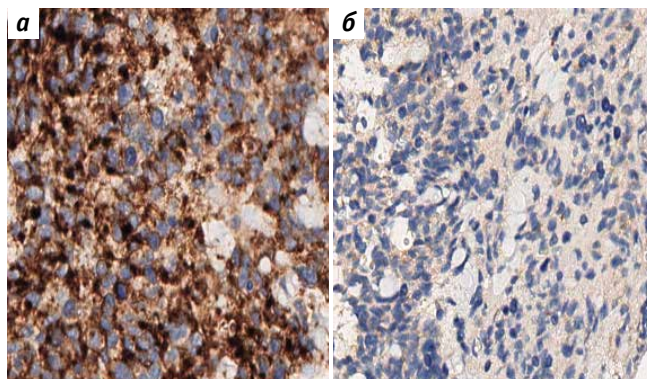


Рис. 7. Иммуногистохимическая картина экспрессии киназы анапластической лимфомы в ткани рабдомиосаркомы: а – клон D5F3; б – клон p80

Fig. 7. Immunohistochemical measurement of anaplastic lymphoma kinase expression in rhabdomyosarcoma tissue: a – D5F3 clone; б – p80 clone

Экспрессию ALK оценивали качественным методом для обоих клонов (p80 и D5F3). Клон ALK D5F3 показал более интенсивную реакцию по сравнению с клоном p80 (рис. 7).

Экспрессия ALK D5F3 в образцах АРМС наблюдалась в 68 % (41/60) случаев, причем в 42 % (25/60) случаев она имела диффузный характер, а в 26 % (16/60) был отмечен фокальный паттерн экспрессии. В остальных образцах положительной реакции с антителом D5F3 обнаружено не было. В то же время экспрессия ALK p80 отмечена лишь в 11 % (7/61) образцов. Из них в 6 % (4/61) случаев она имела диффузный характер, а в 5 % (3/61) – фокальный.

В образцах ЭРМС экспрессия ALK D5F3 выявлена в 30 % случаев: в 23 % она имела фокальный характер, в 7 % – диффузный. При этом экспрессия ALK p80

наблюдалась лишь в 6 % образцов и в основном имела фокальный характер: 5 % (5/99) против 1 % (1/99).

В образцах ткани ВРМС уровни экспрессии обоих клонов антитела к ALK оказались низкими. Положительная реакция с анти-ALK D5F3 выявлена в 1 (7 %) случае из 14 и имела фокальный характер. Положительной реакции с анти-ALK p80 не наблюдалось ни в одном из 16 исследованных образцов. Экспрессия ALK D5F3 и ALK p80 отмечена в 100 % (2/2) случаев ЭпРМС.

Наибольшее количество случаев с положительной реакцией (независимо от варианта РМС) было обнаружено при использовании клона D5F3. Разница чувствительности к экспрессии ALK при применении клона D5F3 и клона p80 оказалась статистически значимой ($p < 0,05$).

Отмечена как диффузная, так и фокальная экспрессия ALK в ткани РМС. При АРМС и ЭРМС фокальная экспрессия встречалась примерно в 1/3 образцов с положительной реакцией (табл. 2). В ткани ВРМС такая экспрессия отмечена лишь в 1 случае, а в образцах ЭпРМС она не выявлена.

Обсуждение

Среди всех исследуемых aberrантных ИГХ-маркеров наиболее интересным с терапевтической точки зрения является ALK. Вклад ALK в онкогенез злокачественных новообразований велик, в связи с чем в настоящий момент разработаны эффективные таргетные препараты — тирозинкиназные ингибиторы, которые потенциально могут быть использованы в терапии РМС [18, 19]. Для выявления ALK-положительных РМС мы использовали 2 клон анти-ALK: p80 и D5F3. Было показано, что определение экспрессии ALK с помощью клона D5F3 позволяет лучше визуализировать и выявлять большое количество положительных образцов ($p < 0,05$).

Также была обнаружена корреляция экспрессии ALK с альвеолярным типом РМС ($p < 0,05$). Кроме того, выявлено, что для АРМС характерна устойчивая связь между уровнем экспрессии ALK D5F3 и миогенных транскрипторных факторов. Во всех случаях АРМС с фокальной экспрессией ALK D5F3 наблюдалась (преимущественно слабо или умеренно) положительная реакция на миогенин и MyoD1. В группах ЭРМС и ВРМС ALK-положительные образцы встречались реже. Полученные нами данные согласуются с результатами многочисленных исследований экспрессии ALK в образцах РМС [20]. Стоит отметить, что гиперэкспрессия ALK на протеомном уровне, которую можно выявить с помощью ИГХ-метода, как правило, связана с одним из таких генетических событий, как перестройка гена *ALK*, амплификация, увеличение копий гена или точечные мутации в нем [21]. Результаты одного ИГХ-исследования недостаточно для назначения тирозинкиназных ингибиторов, поскольку их терапевтической мишенью является химерный транскрипт, образованный в результате перестройки гена *ALK*, который, в свою очередь, можно достоверно детектировать лишь с помощью молекулярно-генетических методов [17–19]. В мировой литературе сообщается, что для РМС наиболее характерна гиперэкспрессия ALK в результате увеличения копий гена, намного реже встречаются амплификации и точечные мутации [21].

Заключение

В образцах АРМС, ЭРМС и ВРМС отмечена равномерная экспрессия ALK. При этом экспрессия ALK D5F3 более характерна для АРМС. Настоящее исследование может послужить обоснованием для проведения таргетной терапии у пациентов с РМС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ognjanovic S., Linabery A.M., Charbonneau B., Ross J.A. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975–2005. *Cancer* 2009;115(18):4218–26. DOI: 10.1002/cncr.24465
- Jo V.Y., Fletcher C.D.M. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology* 2014;46(2):95–104. DOI: 10.1097/PAT.0000000000000050
- Joshi D., Anderson J.R., Paidas C. et al. Age is an independent prognostic factor in rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42(1):64–73. DOI: 10.1002/pbc.10441
- Raney R.B., Anderson J.R., Barr F.B. et al. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. *J Pediatric Hematol Oncol* 2001;23(4):215–20. DOI: 10.1097/00043426-200105000-00008
- Maurer H.M., Gehan E.A., Beltangady M. et al. The intergroup rhabdomyosarcoma study II. *Cancer* 1993;71(5):1904–22. DOI: 10.1002/1097-0142(19930301)71:5<1904::aid-cncr2820710530>3.0.co;2-x
- Meza J.L., Anderson J., Pappo A.S. et al. Analysis of prognostic factors in patients with nonmetastatic rhabdomyosarcoma treated on intergroup rhabdomyosarcoma studies III and IV: The Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2006;24(24):3844–51. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.3801
- Zhang X., Zhang S., Yang X. et al. EML4 and *ALK* is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer* 2010;9:188. DOI: 10.1186/1476-4598-9-188
- Salido M., Pijuan L., Martinez-Aviles L. et al. Increased *ALK* gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011;6(1):21–7. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181fb7cd6
- Coffin C.M., Hornick J.L., Fletcher C.D. Inflammatory myofibroblastic tumor: comparison of clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical features including ALK expression in atypical and aggressive cases. *Am J Surg Pathol* 2007;31(4):509–20. DOI: 10.1097/01.pas.0000213393.57322.c7

10. Cessna M.H., Zhou H., Sanger W.G. et al. Expression of ALK1 and p80 in inflammatory myofibroblastic tumor and its mesenchymal mimics: a study of 135 cases. *Mod Pathol* 2002;15(9):931–8. DOI: 10.1097/01.MP.0000026615.04130.1F
11. De Brouwer B.S., De P.K., Kumps C. et al. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed *ALK* mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* 2010;16(17):4353–62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2660
12. Chen Y., Takita J., Choi Y.L. et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008;455(7215):971–4. DOI: 10.1038/nature07399
13. Mosse Y.P., Laudenslager M., Longo L. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455(7215):930–5. DOI: 10.1038/nature07261
14. Janoueix-Lerosey I., Lequin D., Brugieres L. et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008;455(7215):967–70. DOI: 10.1038/nature07398
15. Берешкеева Л.В., Анучина И.В., Персидский М.А., Калининкова М.О. Анализ частоты встречаемости мутации в гене *ALK* при немелкоклеточном раке легкого у пациентов БУ «Окружная клиническая больница» Ханты-Мансийского автономного округа – Югры. *Здравоохранение Югры: опыт и инновации* 2019;4. Доступно по: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-chastoty-vstrechaemosti-mutatsii-v-gene-alk-pri-nemelkokletochnom-rake-legkogo-u-patsientov-bu-okruzhnaya-klinicheskaya-bolnitsa>. Bereshkeeva L.V., Anuchina I.V., Persidskiy M.A., Kalinnikova M.O. Analysis of the frequency of mutation in the *ALK* gene in non-small cell lung cancer in patients of the District Clinical Hospital of Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra. *Zdravoohranenie Yugry: opyt i innovacii* = Ugra Healthcare: Experience and Innovations 2019;4. (In Russ.). Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-chastoty-vstrechaemosti-mutatsii-v-gene-alk-pri-nemelkokletochnom-rake-legkogo-u-patsientov-bu-okruzhnaya-klinicheskaya-bolnitsa>.
16. Шарлай А.С., Ботиралиева Г.К., Друй А.Е. и др. Распространенность аномалий гена *FOXO1* в группе круглоклеточных рабдомиосарком с альвеолярной морфологией. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020;19(4):82–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-82-87
17. Yoshida A., Shibata T., Wakai S. et al. Anaplastic lymphoma kinase status in rhabdomyosarcomas. *Mod Pathol* 2013;26(6):772–81. DOI: 10.1038/modpathol.2012.222
18. Van Erp A.E.M., Hillebrandt-Roeffen M.H.S., van Houdt L. et al. Targeting anaplastic lymphoma kinase (ALK) in rhabdomyosarcoma (RMS) with the second-generation *ALK* inhibitor ceritinib. *Targeted Oncol* 2017;12(6):815–26. DOI: 10.1007/s11523-017-0528-z
19. Ботиралиева Г.К., Шарлай А.С., Рошин В.Ю. и др. Рабдомиосаркомы: структурное распределение и анализ иммуногистохимического профиля. *Архив патологии* 2020;82(5):33–41. DOI: 10.17116/patol20208205133
20. Wierdl M., Tsurkan L., Chi L. et al. Targeting ALK in pediatric RMS does not induce antitumor activity in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018;82(2):251–63. DOI: 10.1007/s00280-018-3615-7

Вклад авторов

Д.Ш. Полатова: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование;
 Г.К. Ботиралиева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, написание текста статьи;
 Д.М. Коновалов: разработка концепции и дизайна исследования;
 Б.Х. Бабанов: написание текста статьи;
 А.С. Шарлай: статистическая обработка данных, написание текста статьи;
 А.Н. Муратов, С.А. Хайитбоев, А.В. Савкин: статистическая обработка данных;
 М.А. Жахонгирова, Н.К. Асамединов, А.И. Нуржабов: сбор и обработка материала.

Authors' contribution

D.Sh. Polatova: development of the concept and design of the study, editing;
 G.K. Botiraliyeva: development of the concept and design of the study, collection and processing of the material, article writing;
 D.M. Konovalov: development of the concept and design of the study;
 B.H. Babanov: article writing;
 A.S. Sharlay: statistical data processing, article writing;
 A.N. Muratov, S.A. Khayitboev, A.V. Savkin: statistical data processing;
 M.A. Zhakhongirova, N.K. Asamedinov, A.I. Nurzhahov: collection and processing of material.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.Ш. Полатова / D.Sh. Polatova: <https://orcid.org/0000-0001-8128-2553>
 Г.К. Ботиралиева / G.K. Botiraliyeva: <https://orcid.org/0000-0001-6384-7645>
 Д.М. Коновалов / D.M. Konovalov: <https://orcid.org/0000-0001-7732-8184>
 Б.Х. Бабанов / B.Kh. Babanov: <https://orcid.org/0000-0002-6760-0997>
 А.С. Шарлай / A.S. Sharlay: <https://orcid.org/0000-0001-5354-7067>
 А.Н. Муратов / A.N. Muratov: <https://orcid.org/0000-0001-6034-627>
 С.А. Хайитбоев / S.A. Khayitboev: <https://orcid.org/0000-0001-7470-2572>
 М.А. Жахонгирова / M.A. Zhakhongirova: <https://orcid.org/0000-0002-7106-7128>
 А.В. Савкин / A.V. Savkin: <https://orcid.org/0000-0002-3416-5837>
 Н.К. Асамединов / N.K. Asamedinov: <https://orcid.org/0000-0001-5225-1539>
 А.И. Нуржабов / A.I. Nurzhahov: <https://orcid.org/0000-0002-8026-9944>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interests. The authors declare no conflicts of interests.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was conducted without sponsorship.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике Ташкентского государственного стоматологического института.
Пациенты подписали информированное согласие на публикацию своих данных.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Tashkent State Dental Institute.
The patients gave written informed consent to the publication of their data.

Статья поступила: 30.08.2022. **Принята к публикации:** 01.10.2022.
Article submitted: 30.08.2022. **Accepted for publication:** 01.10.2022.