

C-KIT EXPRESSION IN SOFT TISSUE SARCOMAS: PERSPECTIVES OF USAGE GLIVEC

*E. V. Stepanova, R. A. Keschta, A. B. Bohkan, N. N. Petrovichev,
J. N. Dbar, M. D. Aliev, A. Y. Baryshnikov, M. R. Lichinitser
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*

ABSTRACT

c-Kit expression in different types of soft tissue sarcomas was studied using standard assessment criteria. The study included 83 patients treated in Cancer Research Center, Moscow. Histological verification of tumors was done using standard classification of soft tissue tumors. Immunohistochemical research was performed by the standard avidin-biotin technique. Monoclonal antibody to c-Kit was used as primary antibodies (clone T595, dilution 1:20, Novocastra). We found high c-Kit expression in 75 % gastrointestinal leiomyosarcomas. 25 % malignant peripheral nerve sheath tumor and 13 % synovial sarcomas were also c-Kit positive. Thus, the patients with synovial sarcomas and soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin are perspective target for Glivec treatment. Additional studies for c-Kit assessment standardization in tumors are required.

ЭКСПРЕССИЯ С-КИТ В САРКОМАХ МЯГКИХ ТКАНЕЙ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЛИВЕК

*Е. В. Степанова, Р. А. Кешта, Б. Ю. Бохан, Н. Н. Петровичев,
Ж. Н. Дбар, М. Д. Алиев, А. Ю. Барышников, М. Р. Личиницер
Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН*

РЕЗЮМЕ

Целью нашего исследования было изучить экспрессию с-Kit при различных типах сарком мягких тканей с использованием стандартных критериев оценки и определить типы сарком, имеющих высокую частоту экспрессии с-Kit. В исследование включено 83 больных, оперированных по поводу саркомы мягких тканей в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва. Для гистологической верификации опухолей использовали стандартную классификацию опухолей мягких тканей. Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к с-Kit (клон T595, разведение 1:20, Novocastra). Мы обнаружили высокую экспрессию с-Kit в 75% лейомиосарком желудочно-кишечного тракта (гастроинтерстициальных опухолях). Также положительными по с-Kit были 25% злокачественных шванном и 13% синовиальных сарком. Таким образом, больные синовиальной саркомой и саркомами нейроэндокринного происхождения могут быть кандидатами для лечения Гливек. Требуется дополнительные исследования для стандартизации определения экспрессии с-Kit в опухолях.

Введение. Прогресс в молекулярной биологии и биотехнологии открыл огромные возможности для развития новых подходов лечения больных онкологическими заболеваниями. Множество фактов свидетельствуют, что блокирование активности различных рецепторов и белков, участвующих в канцерогенезе, приводит к уменьшению размеров опухоли и продлению жизни больных. Использование новых лекарств направленного действия, селективно воздействующих на белки-мишени в опухолевых клетках, реально уменьшает токсичность и увеличивает эффективность по сравнению с традиционной неспецифической химиотерапией и радиацией.

Совсем недавно для клинической практики был одобрен новый перспективный препарат Гливек (STI571, Glivec®; Novartis Pharmaceuticals) [1]. Было показано, что он является ингибитором рецептора тромбоцитарного фактора роста, всех ABL киназ, а также

частично и с-Kit тирозинкиназы. Основным механизмом действия этого препарата является блокирование связывания АТФ с ферментами, что приводит к ингибированию активности этих киназ [2]. Эффективность препарата показана для хронического миелолейкоза, положительного по мутации BCR/ABL (Филадельфийская хромосома), при гастроинтерстициальных опухолях, содержащих активированный с-kit [3]. Мишенями действия Гливек могут быть и другие типы опухолей мезенхимального и эпителиального происхождения, экспрессирующие с-Kit, для которых этот белок играет важную роль в злокачественной прогрессии [4]. Ген с-Kit кодирует тирозинкиназный рецептор для колониестимулирующего фактора роста (SCF) [5]. Белок с-Kit (CD117 по стандартизированной терминологии для лейкоцитарных антигенов) является трансмембранным тирозинкиназным рецептором III типа (молекулярный вес 145-160 kd). Он имеет высокую степень гомологии

с рецепторами тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и колониестимулирующего фактора роста (CSF-1 или c-fms). c-Kit экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках, тучных клетках, гаметоцитах, меланоцитах, внутриэпителиальных лимфоцитах, внутрипротоковом эпителии молочных желез и интестинальных клетках Кайала желудочно-кишечного тракта [6]. c-Kit является важным фактором для развития и поддержания жизнедеятельности этих типов клеток. Белок имеет значение в туморогенезе некоторых типов опухолей как мезенхимального, так и эпителиального происхождения. В герментативных опухолях, мелкоклеточном раке легкого, нейробластоме, меланоме, раке яичников и миеломе находят высокую экспрессию c-Kit [6].

Экспрессия c-Kit плохо изучена в различных типах мягкотканых сарком [7]. Существуют противоречивые данные о частоте экспрессии c-Kit при различных типах сарком мягких тканей. Предполагается, что саркомы мягких тканей желудочно-кишечного тракта, синовиальные саркомы, остеосаркомы и саркомы Льюиса имеют сильную экспрессию c-Kit в большинстве опухолевых клеток. Менее часто экспрессия c-Kit встречается при лейомиосаркомах другой локализации, чем желудочно-кишечный тракт, нейробластомах и опухолях Вильмса. Экспрессию c-Kit находят в ряде случаев дермафибросаркоматозных протуберанцев, гемангиоэпителиом, светлоклеточных сарком, метастатических меланом и злокачественных фиброзных гистиоцитом [8]. По данным других авторов гастроинтестинальные лейомиомы, лейомиосаркомы, шванномы, карциноиды, злокачественные фиброзные гистиоцитомы, ангиосаркомы и метастатические меланомы, не окрашивались антителами к c-Kit, тогда как гастроинтестинальные опухоли имеют сильное окрашивание антителами к c-Kit [9]. Возможно, это связано с использованием разных критериев оценки экспрессии белка. На сегодняшний день критерием включения больных в исследования эффективности Гливек у больных солидными опухолями является присутствие более 20% положительных опухолевых клеток (интенсивность окрашивания слабая (1+ и более)).

Целью нашего исследования было изучить экспрессию c-Kit при различных типах сарком мягких тканей с использованием стандартных критериев оценки и определить типы сарком, имеющих высокую частоту экспрессии c-Kit. Проведенное исследование поможет выделить типы мягкотканых опухолей, которые могут иметь эффект при лечении Гливек.

Материалы и методы. В исследование включено 83 больных, оперированных по поводу сарком мягких тканей в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва. Для гистологической верификации опухолей использовали стандартную классификацию опухолей мягких тканей. 32 больных имели синовиальную саркому, 13 больных - рабдомиосаркому, 2 больных имели веретенчатую опухоль, и один - ангиолейомиосаркому. У 9 больных была диагностирована лейомиосаркома, из них 4 - желудочно-кишечного тракта и 5 - других локализаций. Злокачественная шваннома была обнаружена у 15

больных, нейрофибросаркома - у 7 больных и нейробластома - у одного больного. У 3 больных обнаружена нейрогенная саркома.

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к c-Kit (клон T595, разведение 1:20, Novocastra). Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм депарафинировали. Для открытия антигенных детерминант проводили обработку срезов в 1 mM растворе ЭДТА (pH 8,0) в течение 45 минут при 95-99°C. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 40°C. Для визуализации реакции антиген-антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему LSAB+kit [DAKO Corp] согласно инструкции. В качестве хромогена использовали ДАБ+ [DAKO Corp]. Затем срезы докрашивали гематоксилином и заключали в бальзам. Окрашивание нормальных меланоцитов кожи антителами к c-Kit использовали как положительный контроль при проведении иммуногистохимической реакции. Для каждой опухоли оценивали интенсивность окрашивания антителами и процент положительных клеток. Опухоль расценивали как положительную, если более 20% опухолевых клеток имели окрашивание (1+ и выше).

Результаты и обсуждение. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к c-Kit было обнаружено в цитоплазме и мембране клеток. Тучные клетки обычно имели окрашивание на c-Kit и использовались как внутренний положительный контроль. Данные об экспрессии c-Kit у больных саркомой мягких тканей различного гистогенеза представлены в таблице 1.

4 (13%) синовиальных сарком также были положительными по c-Kit. Обнаружено, что эпителиоидный компонент опухоли имеет более сильную экспрессию c-Kit по сравнению с эпителиоидным. Среди сарком миогенного происхождения, высокая экспрессия c-Kit была обнаружена только в лейомиосаркомах желудочно-кишечного тракта - 3 опухоли из четырех имели слабое/сильное окрашивание более 50% опухолевых клеток. Ни одна из пяти лейомиосарком другой локализации (лейомиосаркомы мягких тканей конечностей, сальника и др.) не имели окрашивания опухолевых клеток. Только 7% (1 из 13) рабдомиосарком имели окрашивание антителами к c-Kit. Высокую частоту экспрессии c-Kit имеют саркомы нейрогенного происхождения, за исключением нейрофибросарком. 27% (4/15) злокачественных шванном были положительными по маркеру.

В нашем исследовании мы обнаружили экспрессию c-Kit в 75% лейомиосарком желудочно-кишечного тракта, 25% злокачественных шванном и 13% синовиальных сарком. Гастроинтестинальные опухоли желудочно-кишечного тракта (ГИСТ), первоначально классифицируемые как гладкомышечные опухоли - лейомиосаркомы, составляют большую группу опухолей желудка и тонкого кишечника за исключением пищевода. В нашем исследовании, как и в других, найдена высокая экспрессия c-Kit в ГИСТ. Лейомиосаркомы других локализаций не содержали c-Kit.

Опухолевые клетки ГИСТ по своим фенотипическим свойствам (окрашиванию антителами к c-Kit) близ-

Таблица 1
Экспрессия c-Kit у больных саркомой мягких тканей

Опухоль	Количество больных	Экспр c-Kit
Синовиальная саркома	32	1
Рабдомиосаркома	13	7
Лейомиосаркомы	9	3
желудочно-кишечного тракта	4	7
другие	5	0
Ангиолейомиосаркома	1	0
Злокачественная шваннома	15	2
Нейрофибросаркома	7	0
Веретеноклеточная опухоль	2	5
Нейробластома	1	10

ки к интерстициальным клеткам Кайала желудочно-кишечного тракта. Уникальной особенностью этих опухолей является наличие активирующих мутаций 11 экзона генов c-Kit, которые ассоциированы со злокачественным фенотипом опухолей.

Высокая частота экспрессии c-Kit у больных ГИСТ позволила начать клинические испытания Гливек. Эффективность Гливека в I-II фазах клинических исследований (более 200 больных) составила около 60%, только 10-20% больных имеют прогрессирование болезни. Среднее время до наступления эффекта составляет 12 недель [10].

Среди 36 больных метастатическими опухолями ГИСТ, леченных Гливеком, 19 имели частичную ремиссию, 6 больных минимальную ремиссию, 7 больных - стабилизацию процесса и 4 - прогрессирование. 29 больных продолжают лечение более 11 месяцев (от 11 до 15 мес). Существуют перспективы увеличения дозы до 800 мг в день. Оказалось, что двое больных, имевших прогрессирование при дозе 400 мг, при увеличении дозы до 800 мг имеют стабилизацию болезни более 6 мес. Интересно, что по результатам I фазы наличие активирующих мутаций в гене c-kit коррелировало с эффективностью Гливека, больные с экспрессией c-Kit дикого типа имели значительно ниже ответ.

Вторым по частоте экспрессии c-Kit в нашем исследовании были саркомы нейрогенного происхождения - злокачественные шванномы - 25%. Кроме того, нейробластома, вошедшая в исследование, имела окрашивание антителами к c-Kit, одна из двух веретеноклеточных опухолей также была положительной. Экспрессия c-Kit имеет значение в развитии тканей из нейроэктодермы. Рецептор-лигандная система c-Kit-SCF имеет критическое значение для образования и организации нейрональной пластинки при эмбриогенезе, а также клеток происходящих из нее (например, меланоцитов) [11].

Показано, что экспрессия c-Kit имеет значение для развития других опухолей нейроэктодермального происхождения. Так, клеточные линии нейробластом и сарком Юинга содержат c-Kit, и его блокирование приводит к снижению пролиферации и апоптозу клеток. Экспрессия c-Kit и возможность его успешного блокирования показана для периферической нейроэндокринной опухоли [12]. Экспрессия c-Kit в синовиальных сар-

комах показана и в других исследованиях. По данным разных авторов она составляет 10-35%.

Таким образом, больные синовиальной саркомой и саркомы нейроэндокринного происхождения могут быть кандидатами для лечения Гливек. Требуется дополнительные исследования для стандартизации определения экспрессии c-Kit в опухолях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glivec. Clinical Monograph. Novartis Pharma, AG, 2001.
2. Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., et al. Effect of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. // Nat Med, 1996, 2, P. 561-566.
3. Lyseng-Williamson K., Jarvis B. Imatinib // Drugs, 2001, 61(12), P. 1765-1774.
4. Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann J. and Matter A. Glivec (STI571, Imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. // Nat Reviews Drug discovery, 2002, 1, P. 493-502.
5. Yarden Y., Kuang W.S., Yang-Feng T., et al. Human proto-oncogene c-kit, a new cell-surface-receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. // EMBO J, 1987, 6, P. 3341.
6. Galli S.J., Zsebo K.M., Geissler E.N. The kit ligand, stem cell factor. // Adv Immunol, 1994, 55, P. 1-96.
7. Barisella M., Andreola S., Rosai J. CD117 in soft tissue sarcomas. // Am J Clin Pathol, 2002, 118(3), P. 470-471
8. Sarlomo-Rikala M., Kovatich A.J., Barusevicius A., Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. // Mod Pathol, 1998, 11, P. 728-734.
9. Kinblom L.G., Remotti H.E., Aldenborg F., Meis-Klindbom J.M. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. // Am J Pathol 1998, 152, P. 1259-1269.
10. Blanke C.D., von Meheren M., Joensuu H., et al. Evaluation of the safety and efficacy of an oral molecularly-targeted therapy, STI571, in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing C-KIT (CD117). // J Clin Oncol, 2001, 20, P. 1.
11. Nocka K., Majumder S., Chabot B., Ray P., Cervone M., Bernstein A., Besmear P. Expression of c-Kit gene products is known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice. Evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. // Genes Dev, 1989, 3, P. 816.
12. Ricotti E., Fagioli F., Garelli E., Linari C., et al. c-Kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. // Blood, 1998, 91(7), P. 2397-2405.