

ЧАСТОТА ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ГЕНА *ALK* И ОНКОБЕЛКА TAG-72 ПРИ ПЕРВИЧНОЙ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

К.С. Титов¹, Д.Л. Ротин², А.М. Казаков³, О.Ю. Михеева¹, И.М. Тележникова¹, Д.А. Рябчиков⁴

¹ГБУЗ «Московский клинический научный центр ДЗМ»; Россия, 111123 Москва, ш. Энтузиастов, 86;

²ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ»; Россия, 123001 Москва, Мамоновский пер., 7;

³ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Алексей Михайлович Казаков hordavii@yandex.ru

Цель исследования — определить частоту экспрессии тирозинкиназы мутированного гена *ALK* и онкобелка TAG-72 у пациентов с первичной меланомой кожи, определить их связь с рядом гистологических параметров и оценить диагностическую ценность определения *ALK* и TAG-72.

Материалы и методы. Для рутинного гистологического исследования материал фиксировали 10 %-ным нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами D57.3 к *ALK* проводилось на иммуноштейнере Ventana, с антителами B72.3 к TAG-72 на иммуноштейнере Thermo Fischer.

Результаты. *ALK*-мутация была обнаружена в 7 (12 %), TAG-72 — в 4 случаях из 40. Оценка корреляционной силы между экспрессией *ALK* и TAG-72 показала прямую среднюю силу связи (коэффициент корреляции составлял 0,31). Была выявлена прямая связь средней силы между наличием у пациента онкомаркера TAG-72, мутации *ALK* и изъязвлением — коэффициент корреляции составил 0,53 и 0,68 соответственно. Наблюдалась статистически значимая связь между наличием *ALK* и лимфоидной инфильтрацией, которая в большинстве случаев была выраженной ($p < 0,05$).

Выводы. Сопоставляя позитив признака экспрессии *ALK* (17,5 %) и TAG-72 (10 %) и позитив их одновременного обнаружения (7,5 %), можно сделать вывод о том, что дальнейшие исследования по определению их диагностической ценности перспективны. Наличие выраженной лимфоидной инфильтрации у *ALK*-позитивных пациентов претендует на диагностическое значение при первичной меланоме кожи.

Ключевые слова: меланома, *ALK*, лимфоидная инфильтрация

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-50-54

EXPRESSION RATE OF ALK TYROSINE KINASE AND TAG-72 ONCOPROTEIN IN PRIMARY SKIN MELANOMA

K.S. Titov¹, D.L. Rotin², A.M. Kazakov³, O.U. Mischeeva¹, I.M. Telezhnikova¹, D.A. Ryabchikov⁴

¹Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Health Department; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia;

²S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Health Department; 7 Mamonovsky Pereulok, Moscow 123001, Russia;

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

⁴N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Objective. Determine the frequency of occurrence of tyrosine kinase expression of the mutated *ALK* and TAG-72 gene among patients with primary melanoma of the skin, to identify their association with a number of histological parameters, and to assess the diagnostic value of the determination of *ALK* and TAG-72.

Materials and methods. Paraffin blocks with surgical material from 40 patients with primary skin melanoma. For routine histological examination, the material was fixed with 10 % neutral formalin for 24 h, poured into paraffin, sections were prepared with a thickness of 4–5 μm, stained with hematoxylin and eosin. IHC study with monoclonal antibodies D57.3 to *ALK* was performed on an immunostender — Ventana, with antibodies B72.3 to TAG-72 — on Thermo Fischer. As a detection system used: Envision — for TAG-72 and Ventana — for *ALK*.

Results. *ALK* mutation was detected in 7 (12 %), TAG-72 — 4 (10 %) cases. Evaluation of the correlation force between the presence of *ALK* and TAG-72 showed a direct average coupling strength (correlation coefficient was 0.31). A direct correlation of the mean force between the presence of TAG-72 oncoprotein, *ALK* mutation and ulceration in the patient was found — the correlation coefficient was 0.53 and 0.68, respectively. There was a statistically significant association between the presence of *ALK* and lymphoid infiltration, which in most cases (57 %) was pronounced ($p < 0.05$).

Conclusion. Comparing the positive sign of the expression of *ALK* — 17.5 % and TAG-72 — 10 %, and the positive of their simultaneous detection — 7.5 %, it can be concluded that further studies to determine their diagnostic value are promising. The presence of severe lymphoid infiltration in *ALK*-positive patients claims a diagnostic value in primary skin melanoma.

Key words: melanoma, *ALK*, lymphoid infiltration

Введение

На долю меланомы приходится около 4 % всех форм злокачественных опухолей кожи, однако 80 % смертей в данной группе обусловлено именно меланомой. Заболеваемость меланомой кожи в России и многих странах мира неуклонно растет: ежегодно на 5 %. За последние 10 лет в нашей стране заболеваемость меланомой кожи увеличилась на 52 %, а смертность — на 18 %. По абсолютному приросту заболеваемости среди всех злокачественных опухолей меланома кожи занимает 2-е место после рака легкого. В России примерно 22 % пациентов с выявленной меланомой кожи на момент первичного обращения к онкологу имеют уже III–IV стадию опухолевого процесса.

На сегодняшний день выявлено множество причин возникновения меланомы кожи, большинство из которых — драйверные мутации в MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) сигнальном пути. К ним относятся перестройки в генах, кодирующих белки RAS, RAF, MEK1/2 и ERK1/2, наиболее часто встречаются мутации RAF и MEK1/2 [1]. Большинство мутантных белков служат мишенями для современной таргетной терапии. Однако не все пациенты с меланомой имеют данные мутации и, соответственно, мишени для таргетной терапии [2]. Для группы пациентов с отсутствием мишеней для использующейся в настоящий момент таргетной терапии, низкой экспрессией рецепторов и прогностически неблагоприятным количественным и качественным составом лимфоидной инфильтрации для успешного применения ингибиторов иммунных контрольных точек [3, 4] необходим поиск иных подходов к лечению, в частности выявление новых точек приложения таргетной терапии.

Одной из таких точек является ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) — мутация, впервые исследованная в других опухолях (немелкоклеточный рак легкого, анапластическая лимфома) и выявляемая при первичной меланоме кожи в 2–8 % случаев [5]. ALK является рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов, состоящей из 3 доменов: экстрацеллюлярного, трансмембранного и интрацеллюлярного [6]. Существует 3 изоформы мутантной ALK: ALK^{AT1}, ALK wt, EML4–ALK, различающихся по механизму образования (альтернативный сплайсинг, транслокация соответственно) [7, 8]. Мутантная ALK содержит преимущественно интрацеллюлярный домен и обладает повышенной способностью к аутоактивации, что вызывает неконтролируемое деление клеток [9]. Данная мутация может встречаться как отдельно, так и в комбинации с другими мутациями: B-RAF, NRAS (NFI), GNA11, что прогностически неблагоприятно [10]. Этот феномен еще раз подтверждает необходимость опреде-

ления мутации ALK у ряда пациентов, так как ингибирование одной мутации из нескольких не дает должного результата, приводя к последующему прогрессированию болезни [11]. У пациентов с ALK-позитивной меланомой становится возможным применение ингибиторов ALK, эффективно используемых до этого при метастатическом немелкоклеточном раке легкого и анапластической лимфоме [12]. К данным препаратам относятся энсартиниб, церитиниб, кризотиниб, энтректиниб и TAE-684 [13, 14]. Новейшие исследования показали эффективность ингибиторов ALK при терапии EML4 — ALK позитивной меланомы кожи *in vitro* и *in vivo*. Запущено исследование эффективности данных препаратов при лечении ряда опухолей, в том числе меланомы NCT02097810. Изоформы ALK wt и ALK^{AT1}, согласно результатам последних исследований, нечувствительны к ингибиторам ALK [15].

Актуальна в настоящее время и проблема дифференциальной диагностики первичной меланомы кожи, поэтому поиск новых маркеров меланомы также заслуживает внимания. Одним из возможных диагностических маркеров меланомы является Tumor associated protein-72 (TAG-72), активно изучающийся при таких онкологических заболеваниях, как рак яичника, рак желудка и рак легкого, и также претендующий на диагностическое и прогностическое значение при первичной меланоме кожи [16]. Очевидно, что выявление ALK и TAG-72 у пациентов с меланомой кожи в будущем может играть важную роль при выборе метода лечения, а также дифференциальной диагностики и прогнозирования исхода заболевания.

Материалы и методы

В работе использовались парафиновые блоки с операционным материалом от 40 пациентов с первичной меланомой кожи, проходящих лечение в Московском клиническом научном центре с 20 июля 2015 г. по 26 сентября 2016 г. (мужчин — 15, женщин — 25) медиана возраста — 64 года.

В качестве методов исследования применялись гистологическое исследование, морфологический анализ, иммуногистохимическое исследование, статистическая обработка результатов. Оцениваемые признаки морфологического анализа: гистологический тип, толщина по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, изъязвление, степень выраженности лимфоидной инфильтрации, митотический индекс. Для рутинного гистологического исследования материал фиксировали 10 %-ным нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ экспрессии тирозинкиназы ALK и онкобелка TAG-72 проводился иммуногистохимическим методом на срезах, изготовленных с тех же

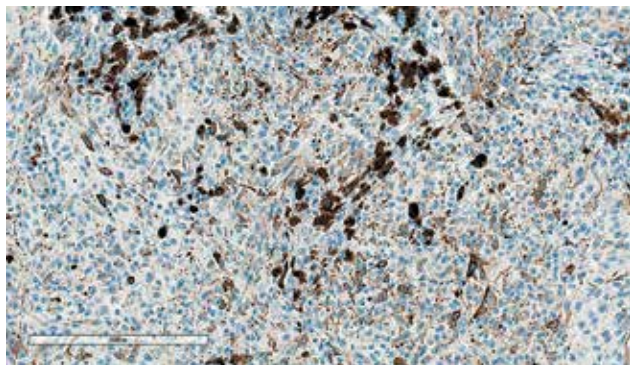


Рис. 1. Выраженная очаговая ядерно-цитоплазматическая положительная экспрессия ALK в клетках опухоли ($\times 200$). Мутантный белок был окрашен моноклональными антителами D57.3

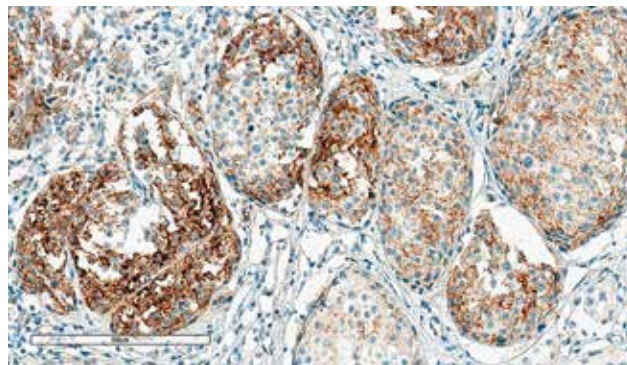


Рис. 2. Умеренная очаговая цитоплазматическая положительная экспрессия ALK в клетках опухоли ($\times 200$). Мутантный белок был окрашен моноклональными антителами D57.3

блоков. Иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами D57.3 к ALK проводилось на иммуностейнере Ventana, с антителами B72.3 к TAG-72 – на Thermo Fischer. В качестве системы детекции использовали: Envision для TAG-72 и Ventana для ALK. Оценку статистической значимости результатов исследования выполняли путем вычисления коэффициента корреляции методом рангов.

Результаты и обсуждение

ALK-мутация обнаружена в 7 (17,5 %) (рис. 1, 2), TAG-72 – в 4 (10 %) случаях (см. таблицу). Мы провели оценку коэффициента корреляции между наличием ALK и TAG-72, которая показала прямую среднюю силу связи (коэффициент корреляции составил 0,31). Также была выявлена прямая связь средней силы между наличием у пациента онкомаркера

Характеристика морфологических параметров и степени выраженности лимфоидной инфильтрации у пациентов с обнаруженной экспрессией ALK и TAG-72

Возраст пациента, лет	Пол пациента	ALK	TAG-72	Локализация	Кларк	Бреслоу	Митотический индекс	Лимфоцитарная инфильтрация опухоли	Изъязвление	Гистологический тип опухоли
65	Ж	+	–	Верхняя конечность и плечевой пояс	3	1,1	$<1/\text{мм}^2$	Умеренная	Нет	Узловая эпителиоидно-клеточная меланома
63	Ж	+	+	Нижняя конечность	4	5	$>1/\text{мм}^2$	Нет	Есть	Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома
65	М	+	+	Корпус	3	4	$>1/\text{мм}^2$	Выраженная	Есть	Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома
67	М	+	–	Корпус	4	4	$>1/\text{мм}^2$	Выраженная	Есть	Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома
48	Ж	+	–	Корпус	4	1	$<1/\text{мм}^2$	Выраженная	Есть	Поверхностно распространяющаяся эпителиоидно-клеточная меланома
68	Ж	+	+	Верхняя конечность и плечевой пояс	2	1	$<1/\text{мм}^2$	Умеренная	Есть	Поверхностно распространяющаяся эпителиоидно-клеточная пигментная меланома
89	Ж	+	–	Голова/шея	5	6	$>1/\text{мм}^2$	Выраженная	Есть	Узловая эпителиоидно-клеточная пигментная меланома
33	М	–	+	Голова/шея	2	1	$>1/\text{мм}^2$	Выраженная	Есть	Поверхностно распространяющаяся эпителиоидно-клеточная меланома

TAG-72, мутации ALK и изъязвлением — коэффициент корреляции составил 0,53 и 0,68 соответственно. Наблюдалась статистически значимая связь между наличием ALK и лимфоидной инфильтрации, которая в большинстве случаев была выраженной ($p < 0,05$). Корреляция между наличием ALK, TAG-72 и другими морфологическими параметрами не выявлена.

Заключение

Несмотря на наличие корреляции средней силы связи между рядом параметров, стоит отметить, что для более достоверных выводов необходимо дальнейшее исследование данной проблемы с увеличением когорты. Однако на данном этапе, сопоставляя наличие экспрессии ALK (17,5 %) и TAG-72 (10 %) и их одновременное обнаружение (7,5 %), можно

сделать вывод о том, что дальнейшие исследования по определению их диагностической ценности представляются перспективными. Наличие корреляционной связи средней силы между изъязвлением, с одной стороны, и наличие онкомаркера и мутантной киназы с другой, также говорит о потенциальной ценности данного явления для усовершенствования диагностики первичной меланомы кожи. Наличие выраженной лимфоидной инфильтрации у ALK-позитивных пациентов претендует на диагностическое значение при первичной меланоме кожи.

Наше исследование показывает перспективность определения ALK и TAG-72, поскольку в совокупности с дальнейшими исследованиями определение данных параметров может улучшить диагностику и лечение пациентов с первичной меланомой кожи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Evans M.S., Madhunapantula S.V., Robertson G.P., Drabick J.J. Current and Future Trials of Targeted Therapies in Cutaneous Melanoma. *Adv Exp Med Biol* 2013;779:223–55. DOI: 10.1007/978-1-4614-6176-0_10. PMID: 23288642.
2. Dhomen N., Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(3):529–45. PMID: 19464601.
3. Jazirehi A.R., Lim A., Dinh T. PD-1 inhibition and treatment of advanced melanoma-role of pembrolizumab. *Am J Cancer Res*. 2016;6(10):2117–28. PMID: 27822406.
4. Titov K.S., Chikileva I.O., Kiselevskiy M.V., Kazakov A.M. Lymphoid infiltration, as a predictor of successful immunotherapy with melanoma. *Malignant Tumors* 2017;1:61–6. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-1-61-66.
5. Yeh I. Recent advances in molecular genetics of melanoma progression: implications for diagnosis and treatment. Department of Dermatology, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA. 2016, Jun 28; 5. (F1000FacultyRev):1529. DOI: 10.12688/f1000research.8247.1 PMID: 27408703.
6. Roskoski R.Jr. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers. *Pharmacol Res* 2017;117:343–56. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.01.007. PMID: 28077299.
7. Montavon G., Jauquier N., Coulon A. et al. Wild-type ALK and activating ALK-R1275Q and ALK-F1174L mutations upregulate Myc and initiate tumor formation in murine neural crest progenitor cells. *Oncotarget* 2014;5:4452–66. PMID: 24947326. PMID: PMC4147337.
8. Takezawa K., Okamoto I., Nishio K. et al. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2140–8. PMID: 21415216.
9. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011. PMID: 20602996.
10. Busam K.J., Villain R.E., Lum T. et al. Primary and metastatic cutaneous melanomas express ALK through alternative transcriptional initiation. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(6):786–95. PMID: 26872010. PMID: PMC5037961.
11. Sosman J.A., Margolin K.A. Inside life of melanoma cell signaling, molecular insights, and therapeutic targets. *Curr Oncol Rep*. 2009;11(5):405–11. PMID: 19679016.
12. Obenauf A.C., Zou Y., Ji A.L. et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 2015;520(7547):368–72. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14336>.
13. Schulte J.H., Bachmann H.S., Brockmeyer B. et al. High ALK receptor tyrosine kinase expression supersedes ALK mutation as a determining factor of an unfavorable phenotype in primary neuroblastoma. *Clin. Cancer Res* 2011;17:5082–92. PMID: 21632861.
14. Cheng D.T., Mitchell T.N., Zehir A. et al. Memorial sloan kettering-integrated mutation profiling of actionable cancer targets (MSK-IMPACT): a hybridization capture-based nextgeneration sequencing clinical assay for solid tumor molecular oncology. *J. Mol. Diagn* 2015;17:251–64. PMID: 25801821.
15. Coutts K.L., Bemis J., Turner J.A. et al. ALK Inhibitor response in melanomas expressing eml4-alk fusions and alternate ALK isoforms. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(1):222–3. PMID: 29054983.
16. Deo Y.M., Tibor K. Bispecific molecules directed to tumor associated glycoprotein-72 and fc receptor. 1997. Pub. No.: WO/1999/019362 International Application No.: PCT/us 1997/018428.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.М. Казаков / A.M. Kazakov: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.