

ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ ГЕНИТАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ У ОНКОЛОГИЧЕСКИ ОТЯГОЩЕННЫХ ПАЦИЕНТОК С МУТАЦИЕЙ ГЕНА KIT (КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ)

**Е.В. Коржевская, А.А. Лушникова, Д.А. Понкратова, И.В. Цыганова,
И.Н. Михайлова, В.В. Кузнецов, Н.Н. Мазуренко**

ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва
e-mail: drkorzhevskaya@mail.ru

Описаны два клинических наблюдения пациенток из онкологически отягощенных семей, у которых была диагностирована рецидивирующая меланома вульвы (МВ). В биопсийном материале у обеих пациенток с помощью специфичной ПЦР была обнаружена мутация — в экзоне 11 гена KIT при отсутствии мутации в генах BRAF и NRAS. Была отмечена положительная динамика в ответ на терапию тирозинкиназным ингибитором иматиниб (Гливек) и временная стабилизация. В процессе дальнейшего лечения у одной из пациенток в метастатически измененном паховом лимфатическом узле была обнаружена минорная мутация гена NRAS, что свидетельствует о молекулярной неоднородности МВ как одной из причин приобретенной резистентности к таргетной терапии.

Ключевые слова: меланома вульвы, мутации гена KIT, таргетная терапия.

TARGETED THERAPY OF GENITAL MELANOMA IN PATIENTS WITH HEREDITARY CANCER WHO HAVE GENE KIT MUTATION (CLINICAL OBSERVATION)

**E.V. Korzhevskaya, A.A. Lushnikova, D.A. Ponkratova, I.V. Tsyganova,
I.N. Mikhailova, V.V. Kuznetsov, N.N. Mazurenko**

Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center»,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

The article describes two clinical cases of patients with family history of cancer who have been diagnosed with recurrent melanoma of the vulva (MV). Using specific PCR and PCR product sequencing exon 11 KIT gene mutation was detected in tumor biopsy material obtained from both patients, while BRAF gene and NRAS gene mutation were absent. Positive dynamics in response to therapy with tyrosine kinase inhibitor Imatinib (Gleevec) and temporary process stabilization were observed. During further treatment a minor NRAS gene mutation was identified in metastatic modified inguinal lymph node of one of the patients, which indicated a molecular heterogeneity of the melanoma of the vulva being one of the cause of acquired resistance to targeted therapy.

Key words: melanoma, vulva, targeted therapy, KIT gene mutation.

Список сокращений:

МВ — меланома вульвы;
SCF — фактор роста стволовых клеток;
PI3K — фосфоинозитид-3-киназа;
PTEN — фосфатаза, негативный регулятор;
PI3K — сигнального пути;
Akt — серин-треониновая протеинкиназа;
mTOR — регуляторный клеточный белок в составе комплексов mTOR1 и mTOR2;
BAD — Bcl 2-связывающий белок, участвующий в регуляции апоптоза;

RAS — Raf- MEK — белки в составе митогенного MAPK-сигнального каскада, регулирующие клеточный метаболизм, деление и апоптоз.

Около 3% всех меланом у женщин локализуется в урогенитальном тракте. Наиболее распространенной формой меланом органов женской репродуктивной системы является меланома вульвы (МВ), которая занимает второе место среди всех злокачественных опухолей вульвы и составляет 2–10% от всех первичных

злокачественных неоплазий этого органа [12]. Обычно МВ диагностируют у пациенток в менопаузе (средний возраст 55–59 лет) и старше, однако возрастной диапазон очень широкий: от 18 до 80 лет. В 90% случаев МВ возникает у представительниц европеоидной расы. Средний возраст пациенток, обследованных нами ранее, составлял 68 лет (от 10 до 99) с локализацией первичной МВ в области клитора (16% наблюдений), до 30% — в области больших половых губ, 26% — в области малых и 21% — больших половых губ, 2% — в неуточненной области [2].

Меланомы слизистых оболочек — агрессивные опухоли, которые отличаются от меланомы кожи по целому ряду клинических и гистопатологических характеристик, а также по терапевтическим подходам. Несмотря на то что для клинического течения МВ характерны не только местный рецидив и/или регионарные метастазы, но и отдаленные метастазы в различных органах и тканях, эту опухоль нельзя назвать заболеванием с однозначно неблагоприятным прогнозом.

Генетические исследования меланомы позволили обнаружить целый ряд мутаций, активирующих клеточные сигнальные пути, а это привело к новым подходам в терапии опухолей, включая МВ. Лечение таргетными препаратами предусматривает ингибирование путей передачи сигналов в опухолевой клетке. Таргетные терапии назначаются в монорежиме, в комбинациях друг с другом, в сочетании с химиопрепаратами.

Показано, что в участках кожи, периодически подвергающихся повышенному ультрафиолетовому облучению, высока частота мутаций гена *BRAF*, тогда как в акральной меланоме и меланоме слизистых оболочек преобладают другие генетические нарушения [14]. Для меланом слизистых оболочек, ногтевого ложа, ладонной и подошвенной поверхностей кожи диагностическое значение имеют мутации и амплификации генов *KIT* и *NRAS*. Частота этих мутаций в меланоме слизистой составляет 11–21% [15]. По другим данным, активирующие мутации гена *KIT* выявляют в 15–40% случаев меланомы слизистых оболочек, наиболее часто — в аноректальных меланоме и в генитальной меланоме наружных половых органов, включая меланомы вульвы, и лишь в 2–6% случаев поверхностной меланомы [11].

Таким образом, результаты исследований показывают, что частота мутаций гена *KIT* в первичной меланоме слизистых оболочек существенно зависит от локализации опухоли: она значительно выше в меланоме вульвы, чем в других типах меланомы слизистых оболочек (35% против 10%). В вагинальных меланоме у 71-й шведской пациентки была отмечена высокая частота мутаций гена *NRAS* (43%) [4]. Следовательно, в меланоме слизистых оболочек активируются оба сигнальных пути — *RAF/MEK/ERK* и *PI3K/AKT*. Однако генетический анализ 65 образцов меланом вульвы и влагалища у немецких пациенток выявил примерно одинаковую (~12%) частоту мутаций гена *NRAS* и амплификаций гена *KIT* при отсутствии мутаций гена *BRAF*. Мутации и амплификация гена *KIT* были обнаружены в 30 из 65 опухолей вульвы и влагалища [10]. Эти данные подтверждают молекулярно-генетическую неоднородность меланомы слизистых оболочек.

Большинство активирующих мутаций локализовано в 11 экзоне гена *KIT*, который кодирует подмембранный домен рецептора, и представлено однонуклеотидными заменами. Как правило, мутантный генотип в первичной опухоли и метастазах меланомы слизистых оболочек совпадают [4]. Протоонкоген *KIT* (*c-kit*) кодирует трансмембранный тирозинкиназный рецептор фактора роста стволовых клеток — *KIT/SCF-R*, который играет важную роль в регуляции дифференцировки промежуточных I-меланобластов в меланоциты и в миграции этих клеток. Этот рецептор активирует несколько важнейших сигнальных путей, включая *RAS-MAPK* и *PI3K-AKT* (рис. 1). При связывании молекул *SCF* (лиганда) с рецептором происходят димеризация, фосфорилирование и активация тирозинкиназы *KIT*. Фосфорилированные остатки тирозина (Y568-Y936) высоко специфично взаимодействуют с другими сигнальными молекулами, активируя соответствующие пути и регулируя ключевые клеточные функции [13].

Несмотря на то что опухоли с активирующими мутациями гена *KIT* чувствительны к иматинибу, большинство из них со временем приобретают резистентность к таргетной терапии этим препаратом или комбинацией иматиниб + нилотиниб + дасатиниб за счет конкурентного ингибирования *MAPK/PI3K* сигнальных

каскадов. Это говорит о необходимости поиска альтернативных ингибиторов, что связано с широким скринингом меланом на мутации онкогенов и кандидатных генов.

Исследование молекулярных механизмов развития меланомы способствовало разработке целого ряда таргетных препаратов, которые стали широко использоваться в качестве альтернативной терапии меланом слизистых оболочек с драйверными мутациями, включая мутации в гене *KIT* [5]. Поэтому генетическое тестирование меланом слизистых оболочек является важным этапом лечения, улучшающим выживаемость и качество жизни больных.

Напомним, что прорыв в лечении диссеминированной меланомы произошел в 2011 году, когда FDA (Федеральное управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) зарегистрировало новый препарат для лечения меланомы — вемурафениб, применение которого улучшило общую выживаемость

пациентов по сравнению со стандартной химиотерапией. В основе действия вемурафениба лежит избирательное ингибирование активности мутантной серин-треониновой протеинкиназы BRAF, обнаруженной ~ в 60% меланомы кожи. Самая частая мутация при меланоме кожи — нуклеотидная замена T1799A в 15 экзоне гена *BRAF* (на белковом уровне замена валина на глутаминовую кислоту V600E), что приводит к гиперактивации BRAF и соответствующего внутриклеточного пути передачи сигнала. Помимо мутации V600E BRAF встречаются и другие мутации (V600K, V600R, V600D и др.).

Для молекулярно-направленного ингибирующего действия в отношении активирующих мутаций гена *KIT*, в основном, применяются иматиниб (Гливек) и нилотиниб (Тасигна). Пациенты с указанными соматическими мутациями отвечают на терапию специфичными ингибиторами тирозинкиназ, а также на системную цитотоксическую химиотерапию [1, 3].

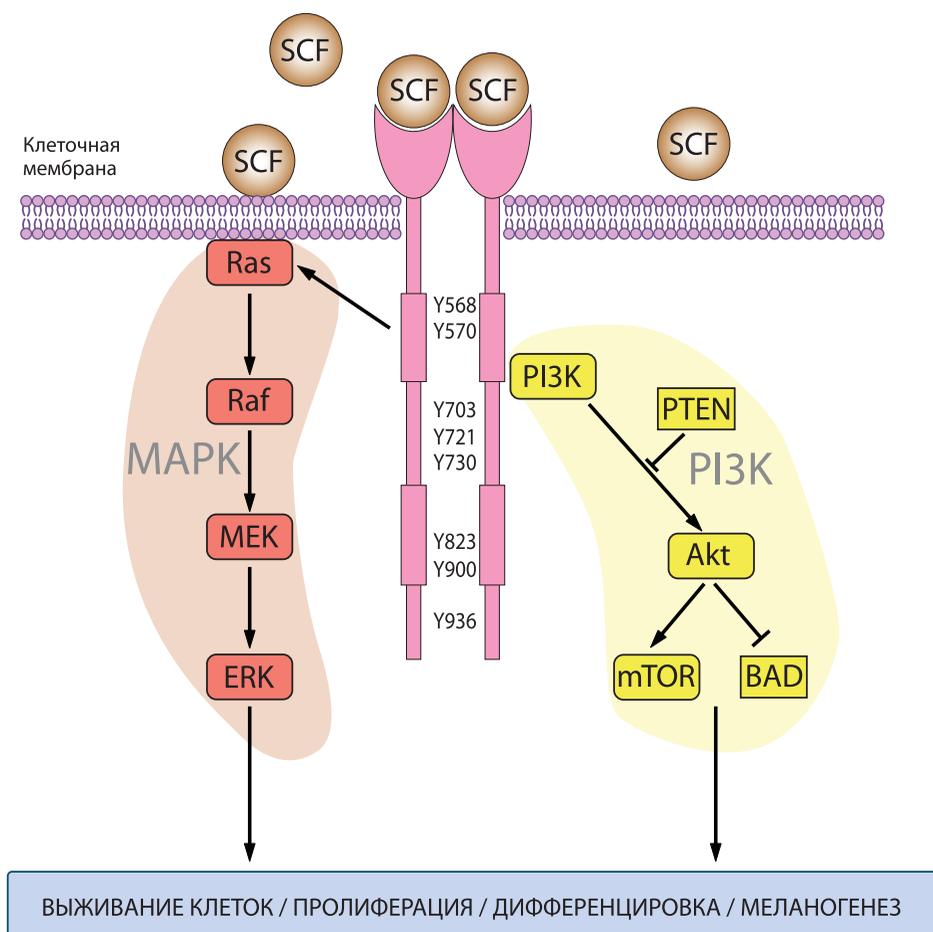


Рис. 1. Схема KIT-сигналинга и активации MAPK и PI3K — сигнальных каскадов

В данной статье описаны два наблюдения рецидивирующей МВ с соматической мутацией гена *KIT*. Обе пациентки имелиотягощенную онкологическую наследственность и отреагировали на терапию Гливеком стабилизацией опухолевого процесса.

Клиническое наблюдение № 1

Пациентка Н., 81 год. Диагноз: первично-множественные злокачественные опухоли. (ПМЗО): 1) Рак Педжета левой молочной железы ПА стадии, состояние после комплексного лечения; 2) Меланома вульвы, состояние в процессе таргетного лечения Гливеком. Безрецидивный период по раку молочной железы составил более 18 лет. Через 17 лет после окончания лечения рака молочной железы была диагностирована пигментная МВ. При гинекологическом осмотре выявлено, что опухоль представлена экзофитным образованием в области клитора, в/3 половых губ с обеих сторон с переходом на наружное отверстие уретры, н/3, с/3 передней и боковых стенок влагалища, синюшного цвета, кровоточащим при дотрагивании. При УЗКТ регионарных лимфатических узлов выявлены метастазы в паховых лимфатических узлах с обеих сторон. Больная соматически отягощена. Хирургическое и лучевое лечение не показаны.

Рак Педжета в левой молочной железе диагностирован в возрасте 63 года, меланома вульвы — в 80 лет. Семейный онкологический анамнез отягощен: в трех поколениях у близких родственников пациентки диагностированы рак легких, рак тела матки и рак поджелудочной железы.

Выполнено генетическое исследование биоптата опухоли. С помощью ПЦР с последующим прямым секвенированием ПЦР-продуктов исследовали мутации в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT*. ПЦР-анализ не выявил мутаций в экзонах 2, 3 гена *NRAS* и в экзоне 15 гена *BRAF*, однако была обнаружена редкая мутация в экзоне 11 гена *KIT*, приводящая к замене глутамина на гистидин в кодоне 556 — Q556→H. Исходя из результатов генетического анализа, пациентке была назначена таргетная терапия Гливеком. По результатам динамического наблюдения в течение шести месяцев отмечена стабилизация процесса.

Через шесть месяцев после начала терапии Гливеком отмечено увеличение размеров мета-

статически измененных паховых лимфатических узлов. Генетический анализ биопсийного материала, взятого из пахового узла, выявил отсутствие мутации гена *KIT*. Однако в ДНК, выделенной из этого метастатического узла, была выявлена минорная мутация в экзоне 2 гена *NRAS*, приводящая к замене глицина на цистеин в кодоне 12 — G12Cys. Считается, что данная мутация резистентна к Гливеку, однако в литературе отмечена чувствительность опухолей, несущих эту мутацию, к иммунотерапии интерлейкином и ипилимумабом [6]. Полученные результаты свидетельствуют о молекулярно-генетической неоднородности меланомы слизистых оболочек гениталий, позволяющей опухоли за счет пролиферации клеток, несущих другие драйверные мутации или другие генетические изменения, избежать воздействия таргетных препаратов.

Клиническое наблюдение № 2

Пациентка Щ., 58 лет. Диагноз: беспигментная эпителиоидноклеточная меланома вульвы T2bN0M0. Состояние после радикальной операции и шести курсов полихимиотерапии. Прогрессирование заболевания в виде продолженного роста. Состояние после хирургического лечения в объеме широкого иссечения. Прогрессирование заболевания: множественные отдаленные метастазы.

Из анамнеза заболевания: в возрасте 58 лет у больной по месту жительства был диагностирован низкодифференцированный рак вульвы. Выполнено удаление опухоли. Через шесть месяцев после хирургического лечения у пациентки диагностирована рецидивная опухоль в области послеоперационного рубца. Произведена биопсия и ИГХ-исследование биоптата. Диагностирована меланома вульвы. По месту жительства рекомендовано лекарственное лечение. Проведено шесть курсов ПХТ по схеме: цисплатин, 110 мг и доксорубицин 70 мг. Осложнение в процессе терапии: явления нейтропении конечностей после ПХТ.

Через три месяца после окончания лечения диагностирован продолженный рост. Выполнено хирургическое лечение в объеме широкого иссечения рецидивной опухоли в области преддверия влагалища. Через девять месяцев при плановом МРТ органов малого таза заподозрено опухолевое образование у левой боковой

стенки таза в развилке наружных и внутренних подвздошных сосудов. Выполнить пункционную биопсию образования не представлялось возможным.

Спустя три месяца по данным МРТ органов малого таза отмечено увеличение размеров образования. При цитологическом исследовании пунктата обнаружены клетки меланомы. Проведено обследование больной. При КТ-исследовании органов грудной клетки, брюшной полости, головного мозга на фоне увеличения имеющегося образования вдоль левой боковой стенки таза выявлены множественные метастатические поражения обоих легких, лимфатических узлов средостения и корней легких, паренхимы печени, забрюшинных лимфатических узлов на уровне Th12-L5.

Семейный онкологический анамнез отягощен: в трех поколениях у близких родственников пациентки диагностированы рак легких, рак желудка и рак гортани.

Выполнено генетическое исследование. С помощью ПЦР с последующим прямым секвенированием ПЦР-продуктов исследовали мутации в генах *BRAF*, *NRAS* и *KIT*. ПЦР-анализ опухолевой ДНК не выявил мутаций в экзонах 2, 3 гена *NRAS* и в экзоне 15 гена *BRAF*, но была обнаружена аналогичная мутация в экзоне 11 гена *KIT* (аминокислотная замена Q556→H).

Исходя из результатов генетического анализа, пациентке была начата таргетная терапия Гливеком 400 мг два раза в неделю. В течение двух месяцев приема Гливека была отмечена стабилизация процесса. В дальнейшем через полтора месяца у больной появился болевой синдром. По данным КТ-исследования органов грудной клетки, брюшной полости, таза выявлена отрицательная динамика. Гливек был отменен, а вместо него назначен Ломустин 80 мг/м² один раз в три недели.

Обсуждение. Прогностическими факторами выживаемости пациентов с меланомой слизистых оболочек немецкие исследователи считают локализацию первичной опухоли и ее толщину. При адекватной терапии десятилетняя выживаемость пациенток с меланомой вульвы составила 64,5% по сравнению с 22,3% при меланомах слизистых оболочек других локализаций [9].

Исследование молекулярных механизмов развития меланомы способствовало разработке

целого ряда таргетных препаратов, которые стали широко использоваться в качестве альтернативной терапии меланомы слизистых оболочек с драйверными мутациями, включая мутации гена *KIT* [5]. Однако спектр и частота мутаций при прогрессировании меланомы слизистых оболочек изучены недостаточно. Опубликованные данные позволяют предполагать наличие в диссеминированной меланоме разных субклонов опухоли, генотип которых может не совпадать с первичной меланомой. Например, при исследовании 291 образца опухолей, полученных от 132 больных меланомой (102 первичных и 165 метастатических новообразований), мутации гена *BRAF* совпали в 75% парных случаев первичной меланомы и метастазов в коже.

Мутации в гене *p16/CDKN2A* в метастазах были выявлены в 14% случаев и лишь в 31% случаев соответствовали мутациям в первичном очаге, обнаруженном в 7% парных случаев [13]. Это создает предпосылки для появления в процессе таргетной терапии резистентных опухолей. Гистопатологический анализ показал, что меланомы с мутациями гена *BRAF* метастазируют с образованием крупных округлых пигментированных очагов чаще, чем меланомы с геном дикого типа или с мутацией гена *NRAS*. Однако в последних уровень пролиферации опухолевых клеток в среднем выше и они лучше отвечают на иммунотерапию [7]. Вопрос о комбинированной терапии меланомы слизистых оболочек нуждается в дальнейшем изучении. Например, удалось преодолеть устойчивость опухоли к ингибиторам BRAF путем комбинации ингибитора MEK (траметиниба) с ингибитором PI3K/mTOR (дабрафенибом) [8].

Заключение. Проведен клинико-генетический анализ двух пациенток с рецидивирующей меланомой вульвы (МВ) и отягощенным онкологическим анамнезом. В ходе исследований при помощи специфичной ПЦР в опухолевых клетках была обнаружена соматическая мутация в экзоне 11 гена *KIT*, мутации в гене *BRAF* не выявлены. При анализе клинической картины у пациенток была отмечена положительная динамика в ответ на терапию тирозинкиназным ингибитором иматиниб (Гливек). В процессе дальнейшего лечения у одной из пациенток в метастатически измененном паховом лимфатическом узле была обнаружена мутация гена

NRAS, что свидетельствует о молекулярной неоднородности МВ и о возможности приобретения резистентности к таргетной терапии в процессе опухолевого роста. Вероятно, для более длительной стабилизации процесса требуется комбинированное лечение, включающее иммунотерапию.

Отмечено, что большинство меланом слизистых, несущих мутации гена *KIT* (*c-Kit*), первоначально чувствительных к терапии иматинибом, впоследствии приобретают резистентность к этому препарату, а также тирозинкиназным ингибиторам нилотинибу и дасатинибу за счет вторичных мутаций гена *KIT*, что приводит к прогрессии заболевания. Однако такие опухоли могут быть чувствительны к терапии суинитинибом или альтернативными ингибиторами МАРК/PI3K сигнальных путей [16].

Феномен внутриопухолевой гетерогенности меланомы вульвы — возможности сосуществования в пределах одной опухоли клеточных клонов с различным онкогенотипом — требует дальнейших исследований. Такая гетерогенность, обусловленная генетическими различиями между клетками первичной опухоли, может быть усилена влиянием эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов (метилованием, модификацией структуры хроматина, дифференциальной экспрессией некодирующих РНК и др.) и геномной нестабильностью опухоли в целом. Оптимизация молекулярно-генетических исследований меланомы вульвы и влагалища позволяет определить мутационный статус злокачественной опухоли и персонализировать терапию, улучшив прогноз, выживаемость и качество жизни больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демидов Л.В., Утяшев И.А., Харкевич Г.Ю. Роль вемурафениба в лечении диссеминированной меланомы кожи // Современная онкология. — 2013. — № 3 — С. 3–6.
2. Коржевская Е.В., Кузнецов В.В., Михайлова И.Н. Клинический анализ 38 наблюдений меланомы вульвы: Материалы Российской конференции по онкогинекологии, 8–9 апреля 2009, Москва // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2009 — № 20 (2). — С. 67.
3. Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи // Успехи молекулярной онкологии. — 2014. — № 2. — С. 26–35.
4. Aullmann S., Sinn H.P., Penzel R. et al. Comparison of molecular abnormalities in vulvar and vaginal melanomas. *Mod. Pathol.* — 2014; doi:10.1038/modpathol.2013.211.
5. Carlino M.S., Todd J.R., Rizos H. Resistance to c-Kit inhibitors in melanoma: insights for future therapies. *Oncoscience.* — 2014; 1 (6): 423–6.
6. Colombino M., Capone M., Lissa A. et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumor and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol.* — 2012;30(20):2522–29.
7. Fedorenko I.V., Gibney G.T., Smalley S.M. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene.* — 2013; 32 (25): 3009–30018.
8. Greger J.G., Eastman S.D., Zhang V., Bleam M.R., Hughes A.M., Smitheman K.N. et al. Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. *Mol. Cancer. Therap. Apr.* — 2012; 11 (4): 909–920.
9. Mehra T., Grozinger G., Mann S. et al. Primary localization and tumor thickness as prognostic factors of survival in patients with mucosal melanoma. *PLoS ONE.* — 2014; 9 (11): e 112535.
10. Omholt K., Grafström E., Kanter-Lewensohn L. et al. KIT Pathway Alterations in Mucosal Melanomas of the Vulva and Other Sites. *Clin. Cancer. Res.* — 2011, 7 (12); 3933–42.
11. Pracht M., Mogha A., Lespagnol A. et al. Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* — 2015; doi: 10.1111/jdv.12910.
12. Raspagliesi F., Ditto A., Paladini D. et al. Prognostic indicators in melanoma of the vulva. *Ann.Surg.Oncol.* — 2000; 7(10):738–42.
13. Rönnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci.* — 2004, 61(19–20):2535–48.
14. Sakaisawa K., Ashida A., Uchiyama A. et al. Clinical characteristics, associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci.* — 2015. doi 10.1016/j.jdemsci2015.07.012.
15. Tacastacas J.D., Bray J., Cohen Y.K. et al. Update on primary mucosal melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* — 2014; 71 (2): 366–75.
16. Todd J.R., Becker T.M., Kefford R.F., Rizos H. Secondary c-Kit mutations confer acquired resistance to RTK inhibitors in c-Kit mutant melanoma cells *Pigment Cell & Melanoma Res.* — 2013; 26(4): 518–26.