

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»

Медицинский факультет. Кафедра онкологии

**Г.А. Раскин, М.С. Мухина, А.С. Каурцева,
А.Э. Протасова, Р.В. Орлова**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ
И СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ НЕСПАРЕННЫХ
НУКЛЕОТИДОВ ДНК (MMR/MSI) ПРИ ОПУХОЛЯХ
РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ**

Учебное пособие
Санкт-Петербург
2022

УДК: 616-006.6

ББК: 55.6

Г.А. Раскин, М.С. Мухина, А.С. Каурцева, А.Э. Протасова, Р.В. Орлова.

Определение микросателлитной нестабильности и состояния генов репарации неспаренных нуклеотидов ДНК (MMR/MSI) при опухолях различных локализаций – СПб., 2022. – 23 с.

Раскин Г.А. – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии Санкт-Петербургского государственного университета, заведующий патологоанатомическим отделением МИБС.

Мухина М.С. – кандидат медицинских наук, врач КДЛ патологоанатомического отделения МИБС.

Каурцева А.С. – врач-патологоанатом ПАО МИБС.

Протасова А.Э. – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии Санкт-Петербургского государственного университета.

Орлова Р.В. – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой онкологии Санкт-Петербургского государственного университета.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Руководитель лаборатории иммуногистохимии Республиканского клинического онкологического диспансера МЗ РТ, профессор кафедры патологии Казанского государственного медицинского университета, д.м.н., профессор **Петров С.В.**

Заведующий отделением биотерапии ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», д.м.н. **Моисеенко Ф.В.**

Утверждено

в качестве учебного пособия Ученым советом

ФГБУ ВО СПбГУ

протокол №05/2.1\30-03-3 от «21» марта 2022 г.

© Коллектив авторов, 2022 г.



СОДЕРЖАНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	03
ВВЕДЕНИЕ.....	04
ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ.....	05
ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ MMR/MSI.....	06
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ MMR/MSI.....	07
СОБСТВЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ.....	13
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	16
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ.....	17
ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ.....	19
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	20

СПИСОК СОКРЩЕНИЙ:

MSI – микросателлитная нестабильность.

MSS – микросателлитно-стабильная опухоль.

MSI-H – микросателлитная нестабильность высокой степени.

MMR – система репарации неспаренных нуклеотидов ДНК.

dMMR – повреждение (дефицит) репарации неспаренных нуклеотидов ДНК.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ИГХ – иммуногистохимия.

NGS – секвенирование нового (следующего) поколения.

НАПХТ – неоадъювантная полихимиотерапия.



ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одними из основных в структуре причин смертности населения. Было отмечено, что применение стандартных подходов к лечению в виде оперативных вмешательств в комбинации с адъювантной химиотерапией в некоторых случаях не только не позволяет получить ожидаемый положительный эффект, но и может приводить к значимому снижению общей продолжительности жизни части больных (An J.Y. et al., 2012; Smyth E.C et al., 2017; Ratti M. et al., 2018).

Развитие методов молекулярной диагностики позволило выявить группу пациентов с опухолями, имеющими особый молекулярный патогенез, заключающийся в наличии дефекта системы репарации неспаренных нуклеотидов ДНК. Помимо прогностического значения, это дало возможность рассмотреть варианты персонализированного подхода к лечению с назначением им иммунотерапии, являющейся не только максимально эффективной, но и единственно безопасной у данной категории больных.

Определение наличия дефекта системы репарации является широкодоступным методом, поскольку в большинстве случаев может ограничиваться проведением иммуногистохимического исследования. Тем не менее, несмотря на исключительную важность и относительную простоту определения, части пациентам, в особенности в регионах России, не выполняется данное исследование.

Методические рекомендации разработаны на основе современных протоколов с использованием собственных данных и предназначены, в первую очередь, для врачей-онкологов и врачей-патологоанатомов. Целью учебного пособия является повышение осведомленности специалистов по данной теме с представлением как базовых понятий, так и проблем, имеющих на современном этапе. Мы надеемся, что данное учебное пособие поможет справиться со сложностями в интерпретации результатов исследования, а также повысят выявляемость онкологических больных, требующих проведения иммунотерапии.

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

В процессе жизнедеятельности нормальные клетки организма претерпевают множество делений, что сопровождается многократной репликацией ДНК. Во время репликации спонтанно, либо под действием различных экзогенных воздействий (ультрафиолет, рентгеновские лучи, химические соединения и т.д.) ежедневно в каждой клетке человека возникают множественные повреждения и ошибки в синтезируемой цепи ДНК. Этот процесс не приводит к фатальным последствиям за счет функционирующих в норме в организме человека систем репарации ДНК, обеспечивающих генетическую стабильность.

Одной из главных систем является **система репарации неспаренных нуклеотидов ДНК (Mismatch Repair System – MMR)**, ключевую роль в функционировании которой играют четыре гена: MLH1 (mutL homologue 1), MSH2 (mutS homologue 2), MSH6 (mutS homologue 6) and PMS2 (postmeiotic segregation increased 2). Эти гены кодируют одноименные белки – MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, существующие в виде гетеродимеров MLH1-PMS2 и MSH2-MSH6.

Часть опухолей имеет нарушение функционирования одного из этих генов из-за спорадических или герминальных (наследственных) мутаций, что приводит к нарушению MMR (dMMR) (Имянитов Е.Н. и соавт. 2010; Lindor N.M. et al. 2002).

При этом следует отметить, что мутации в генах MLH1 и MSH2 приводят к протеолитической деградации второго белка-партнера, в отличие от мутации в генах PMS2 и MSH6, сопровождающихся деградацией только одноименного белка. Это происходит за счет того, что белки MLH1 и MSH2 могут образовывать гетеродимеры с другими белками системы репарации, такими как MSH3, MLH3, PMS1, таким образом, MSH6 может быть замещен в гетеродимере на MSH3, а PMS2 на PMS1 либо MLH3 (Lindor N.M. et al. 2002).

В ДНК имеются участки, где нуклеотиды образуют повторы от 1 до 6 оснований, так называемые микросателлиты. В процессе репликации ДНК могут происходить изменения в данных последовательностях в результате инсерции (вставки) оснований. В норме данные мутации устраняются MMR. Накопление таких изменений в микросателлитах приводит к возникновению состояния генетической нестабильности – генетической гипермутабельности, **или микросателлитной нестабильности (Microsatellite Instability – MSI)**. Таким образом, MSI является фенотипическим свидетельством того, что система репарации (MMR) не функционирует нормально.

Опухоли, характеризующиеся наличием микросателлитной нестабильности, принято обозначать как MMR-дефицитные опухоли (dMMR/MSI-H).

Опухоли, не имеющие мутаций, генетически стабильные, принято обозначать как MMR-профицитные опухоли (pMMR/MSS). Обозначение MSI-H (High) связано с выделением до недавнего времени высокого (high) и низкого (low) уровня микросателлитной нестабильности, основанного на количестве генов, подверженных мутации, определяемых методом ПЦР. В настоящее время, согласно рекомендациям ESMO от 2019 года, MSI-Low опухоли включены в группу микросателлитно стабильных (MSS) (Luchini C. et al. 2019).

ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ MSI

Любая опухоль, имеющая этот необычный вариант молекулярного патогенеза – микросателлитную нестабильность, имеет тысячи мутаций в микросателлитных повторах и других участках генома. Образование столь большого количества неоантигенов приводит к относительно стереотипной реакции активации Т-лимфоцитов с последующей инфильтрацией ими опухоли. Механизмом ускользания опухоли от иммунного ответа в данном случае становится экспрессия клетками опухоли молекул сверочных точек, в том числе PD-L1, что создает возможность использования ингибиторов сверочных точек, таких как анти-PD1, для лечения данных больных. Анти-PD1 препарат блокирует взаимодействие между лигандами сверочных точек и родственными им рецепторами на эффекторных клетках, что обуславливает мощный противоопухолевый эффект. Причем количество мутаций в клетках опухоли коррелирует с ответом на анти PD-1 терапию.

Таким образом, большая часть мутантных неоантигенов в MMR-дефицитных опухолях являются чувствительными к блокаде молекул сверочных точек, вне зависимости от тканевого происхождения опухоли. Это позволило FDA 23 мая 2017 года, а затем и Росздравнадзору 1 мая 2019 года зарегистрировать анти-PD1 препарат для лечения любой солидной опухоли с dMMR/MSI-H. Так впервые был одобрен препарат для противоопухолевого лечения, показания для применения которого основывались не на типе опухоли и ее локализации, а на наличии молекулярного маркера.

В то же время данный баланс MMR-дефицитных гиперантигенных раковых клеток и иммунных клеток, ингибированных молекулами сверочных точек, вероятно, тормозит прогрессирование опухоли, обуславливая лучшую выживаемость данных пациентов по сравнению с MMR-профицитными опухолями, в частности рака желудка и толстой кишки (Smyth E.C. et al., 2017, An J.Y. et al., 2012). Использование же химиотерапии у больных MMR-дефицитным раком

желудка или толстой кишки либо не приводило к эффекту по данным одних исследователей (Choi Y.Y. et al., 2019), либо вызывало быстрое прогрессирование и преждевременную смерть пациентов с dMMR/MSI-H (Smyth E.C. et al., 2017; An J.Y. et al., 2012; Janjigian Y.Y. et al., 2018). Авторы объясняют это разрушением иммунного барьера вокруг раковых клеток химиотерапевтическими препаратами и провоцированием диссеминации опухоли (Smyth E.C. et al., 2017). Таким образом, чрезвычайно важно исследовать MMR/MSI при аденокарциномах желудка и толстой кишки на биопсийном материале до принятия решения о назначении химиотерапии. Особенно это значимо для рака желудка, где назначение периоперационной химиотерапии, согласно клиническим рекомендациям, утвержденным Миндравом РФ (2018 г.), необходимо начиная с 1b стадии, и вслепую она может быть назначена тем пациентам, которым химиотерапия противопоказана.

Надо отметить, что по данным литературы dMMR/MSI-H может встречаться практически в любой солидной опухоли (Dung T. Le. et al., 2017). Мы в своих исследованиях, помимо частых локализаций, таких как: рак толстой кишки, рак желудка, рак эндометрия, – выявляли dMMR/MSI-H при анапластическом раке щитовидной железы, при плоскоклеточном раке пищевода, при мелко-клеточном раке легкого, при аденокарциноме легкого, при глиобластоме, при метастазе без первично-выявленного очага, при уротелиальном раке.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ MMR/MSI

Определение MMR/MSI возможно тремя методами: иммуногистохимическое исследование, ПЦР-исследование, секвенирование нового поколения. Согласно рекомендациям ESMO 2019 года первым методом в определении MSI/MMR является иммуногистохимия (рекомендация А, сильная степень консенсуса 8,7/10). ПЦР – это метод второй линии в случае получения сомнительных результатов при иммуногистохимии (рекомендация В). Однако панель экспертов ESMO рекомендует использовать оба метода для определения MMR/MSI в случае метастатического колоректального рака и других опухолей из спектров синдрома Линча при рассмотрении вопроса о применении иммунотерапии. NGS – может стать методов выбора для тестирования MMR/MSI и других мутаций всех типов опухолей (рекомендация С, очень сильная степень консенсуса 9/10), основное ограничение – малая доступность метода (Luchini C. et al. 2019).

1. Определение MMR/MSI иммуногистохимическим методом

ИГХ-исследование является наиболее простым и доступным методом определения MMR/MSI. Для проведения тестирования могут использоваться как биопсийные, так и операционные образцы.

Основные преимущества проведения исследования на образцах биопсии:

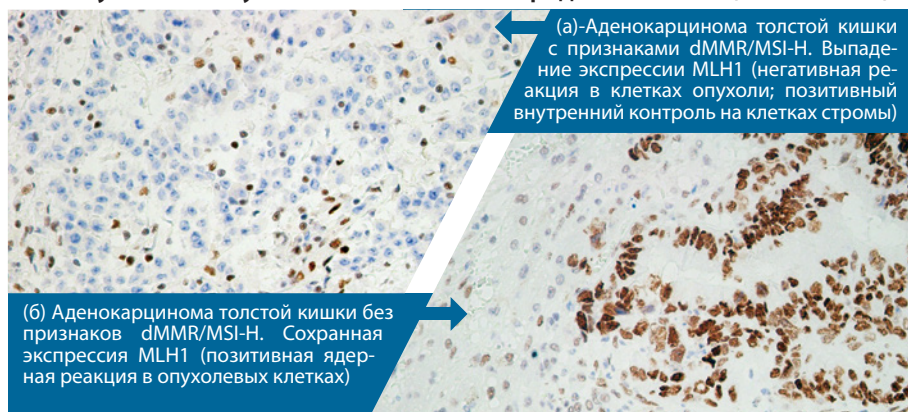
- лучшая фиксация материала, что снижает вероятность получения ложноположительного результата,
- получение информации о MMR/MSI-статусе опухоли на дооперационном этапе с целью дальнейшего планирования лечения.

Основные преимущества проведения исследования на операционных образцах:

- большой объем материала, возможность выбора наиболее подходящего фрагмента для исследования,
- наличие внутреннего контроля (например, нормальная слизистая оболочка, клетки воспалительного инфильтрата),
- снижение вероятности получения ложноотрицательного либо ложноположительного результата при гетерогенности опухоли (особенно важно при раке эндометрия).

ИГХ-метод определения MMR/MSI заключается в детекции белков системы репарации с помощью специфической реакции антиген-антитело. Соответственно при постановке данной реакции используются антитела к основным четырем белкам системы MMR: MSH2, MSH6, PMS2, MLH1.

Рисунок 1. Иммуногистохимическое определение MMR (белок MLH1):

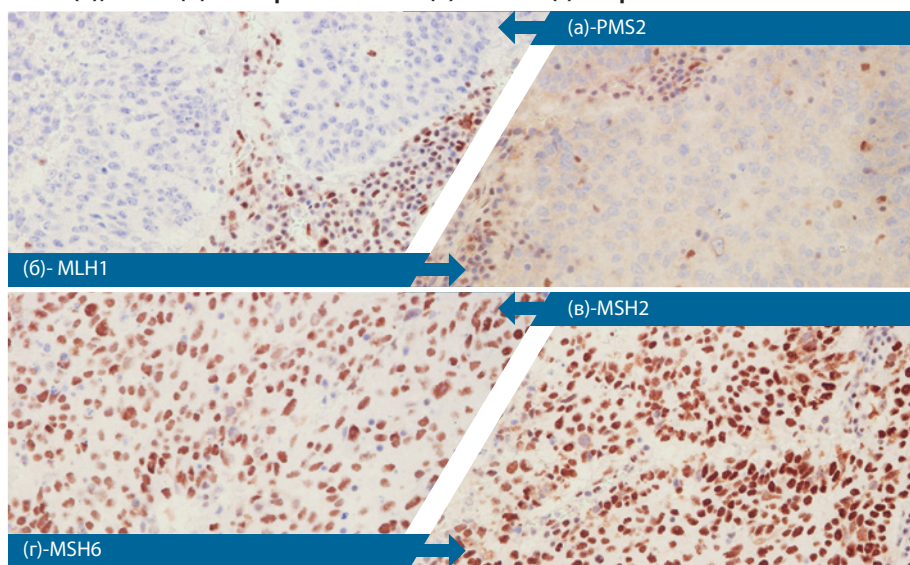


Согласно исследованиям NordiQC от 2018-2020 гг. наиболее оптимальными клонами для определения MSH6 является EP49, MSH2 – FE11 или G219-1129, PMS2 – EP51, MLH1 – ES05 и M1.

При наличии MSI, то есть возникновения мутации в каком-либо из генов, отвечающих за систему репарации, происходит деградация белка, следовательно, не возникает специфической реакции между антителом и антигеном, а значит ядерное окрашивание в клетке, имеющей мутацию, отсутствует (рис.1а). Напротив, в клетках MMR-профицитных опухолей, а также в нормальных клетках тканей организма будет отмечаться позитивная ядерная реакция при использовании всех четырех антител (рис.1б).

Как упоминалось выше, мутации в гене MLH1 связаны с протеолитической деградацией и второго белка-партнера – PMS2 (рис.2), также, как и мутации в гене MSH2 связаны с деградацией как белка MSH2, так и MSH6. В то же время мутации в генах PMS2 и MSH6 могут не приводить к потере белка-партнера. В связи с этим, руководствуясь экономическими и временными соображениями, иногда можно рассмотреть возможность скринингового исследования только двух белков – MSH6 и PMS2, с последующим исследованием белков-партнеров в случае определения потери экспрессии MSH6 либо PMS2.

Рисунок 2. Эндометриоидный рак эндометрия с выпадением экспрессии PMS2(а), MLH1(б). Экспрессия MSH2(в) и MSH6(г) сохранена.



Сложности с интерпретацией ИГХ-исследования связаны, главным образом, с получением ложноположительных (с наличием MMR) результатов, которые зачастую обусловлены преаналитическими проблемами, такими как неадекватная фиксация тканей (рис.3). Окрашивание в клетках опухоли может как полностью отсутствовать, так и может отмечаться aberrantное окрашивание в виде цитоплазматической, точечной (dot-like) или перинуклеарной реакции. В этом случае необходимо ориентироваться на реакцию во внутреннем контроле (стромальные элементы, воспалительные клетки, неопухолевые прилежащие клетки органа), что подчеркивает важность правильно осуществленного преаналитического этапа и тщательного отбора образца для исследования. Кроме того, в таком случае необходимо исследование всех четырех белков, и, в случае получения неубедительных результатов,- тестирование MSI другими методами.

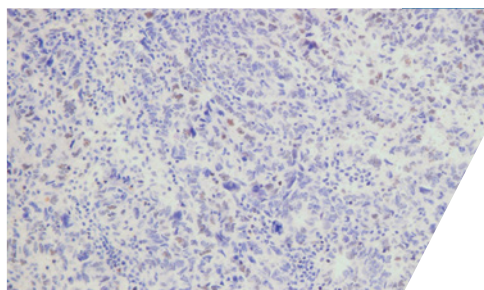


Рисунок 3. Ошибки в интерпретации исследования MMR. Нарушение в протоколе фиксации / проводки материала.

Другой проблемой иммуногистохимической оценки статуса MMR/MSI является гетерогенность dMMR/MSI-H в различных клонах клеток опухоли. Проявляется это тем, что часть опухоли оказывается позитивной на белок MMR, а другие раковые клетки теряют его (рис. 4). По данным литературы данная проблема преимущественно характерна для рака эндометрия и редко встречается при других локализациях (Jansen A.M.L. et al., 2017). Однако наши наблюдения показали, что гетерогенность статуса dMMR может наблюдаться в опухолях любых локализаций, в том числе аденокарциномы толстой кишки, желудка. Особую важность гетерогенность dMMR/MSI-H приобретает в случае прогрессирования заболевания (рецидив или метастаз). Так в ряде случаев наблюдалась дискордантность между статусом MMR/MSI между первичной опухолью тела матки и метастазом, причем в первичной опухоли статус MSS, а в метастазе dMMR/MSI-H. Авторы объясняют это гетерогенностью dMMR/MSI-H в первичной опухоли (Ta R.M. et al. 2018). В своих наблюдениях мы выявляли случаи, когда гете-

рогенность опухоли по dMMR сопровождалась как метастазом с dMMR, так и с pMMR. Более того, в одном случае рака желудка нами были выявлены в метастатическом очаге сразу 2 клона: с dMMR и pMMR. Все это приводит к логическому выводу о необходимости ре-биопсии для уточнения статуса MMR/MSI в случае прогрессирования заболевания. Кроме того, очевидно, что такие методы как NGS и ПЦР, не способны к определению гетерогенности опухоли, и требуется осторожность в интерпретации их результатов.

Однако и при иммуногистохимической оценке MMR/MSI могут быть проблемы. При наличии миссенс-мутации в MMR-генах (преимущественно MSH6), приводящей к изменениям первичного белка, который становится каталитически неактивен, но антигенно интактен, возможно получение ложноотрицательных (позитивное окрашивание) результатов ИГХ-исследования (редкая ситуация, менее 1% случаев).

В целом, ИГХ-исследование остается наиболее доступным и достаточно точным методом исследования, рекомендуемым для первичного определения dMMR/MSI-H.

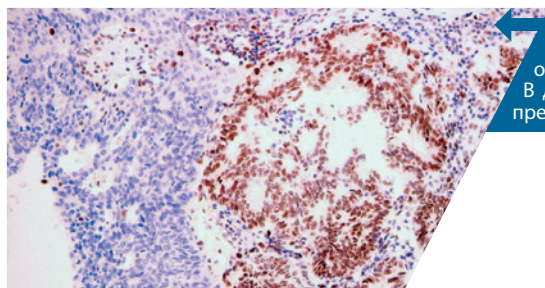


Рисунок 4. Позитивная реакция в части опухоли на PMS2 (коричневое окрашивание правой части опухоли). В другой части отмечается потеря экспрессии PMS2 (левая часть опухоли).

2. Молекулярное исследование MSI-ПЦР

Молекулярное определение MSI методом ПЦР рекомендовано в случаях с неопределенными результатами ИГХ-исследования, а также в случае потери только одной субъединицы гетеродимера. В настоящее время рекомендуется использование панели D5S346, D2S123, D17S250, BAT25, BAT26 или BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27, которые обладают более высокой чувствительностью и специфичностью. Наличие MSI определяется как потеря стабильности в 2 или более из 5 микросателлитных маркеров.

Ранее было упомянуто, что используемое разделение на микросателлитную нестабильность высокой и низкой степени (MSI-High и MSI-Low) в настоя-

щий момент не рекомендовано; опухоли с MSI-Low включены в группу микросателлитно-стабильных (MSS) (Luchini C. et al. 2019).

В целом, по точности определения MSI, иммуногистохимический метод сопоставим с ПЦР-исследованием при аденокарциноме толстой кишки. При других локализациях сведения разнятся, и предпочтение, вероятно, следует отдавать иммуногистохимии или NGS. Так, мы проводили сравнительное исследование иммуногистохимии, выполненной в нашей лаборатории, с ПЦР, проведенной в одной из центральных лабораторий РФ. Конкордантность была всего около 20% при использовании стандартной панели на MSI, при обращении в другую лабораторию и использовании более широкой ПЦР панели конкордантность составила уже 91%. При применении NGS совпадение с ИГХ составило 97%. В одном из исследований, проводимых на 213 образцах эндометриоидной карциномы, конкордантность между ПЦР и ИГХ составила 96,9%, дискордантность – 3,1% (Bruegl A.S. et al., 2017).

3. Секвенирование нового поколения (NGS)

Секвенирование нового поколения представляет собой наиболее чувствительный и специфичный молекулярный тест для оценки MSI. Основным преимуществом секвенирования является возможность одновременного определения, помимо микросателлитной нестабильности, других мутаций, определяющих подход к терапии, таких как KRAS мутацию при колоректальном раке, EGFR мутацию при немелкоклеточном раке легкого, BRCA1 и BRCA2 мутации при раке молочной железы и раке яичников. Таким образом, секвенирование нового поколения может являться методом выбора при тестировании любых злокачественных опухолевых процессов, в том числе, не относящихся к спектру опухолей синдрома Линча. Ограничениями исследования NGS является его высокая стоимость вкупе с низкой доступностью и отсутствием финансирования со стороны ОМС на настоящий момент, а также недоступность определения гетерогенности опухоли.

СОБСТВЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ:

Клинико-морфологическое наблюдение 1.

Пациент женщина 58 лет. Аденокарцинома желудка, pT4N1 (III стадия). НАПХТ не проводилась, лечение выполнено в объеме дистальной резекции желудка. При проведении гистологического исследования выявляется низкодифференцированная аденокарцинома, умеренно инфильтрированная лимфоидными клетками (рисунок 5).

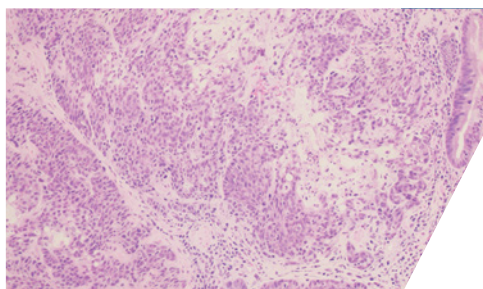
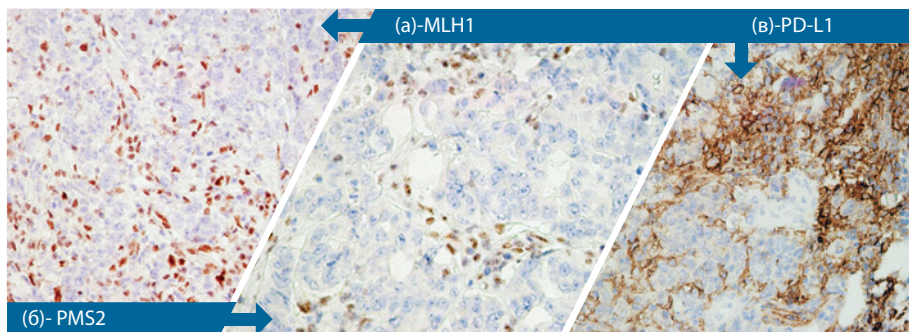


Рисунок 5. Низкодифференцированная аденокарцинома желудка с признаками dMMR/MSI-H, отмечается умеренная инфильтрация лимфоидными клетками, увеличение X200.

При проведении иммуногистохимического исследования на белки MMR была выявлена негативная реакция в опухоли на PMS2 и MLH1 (рис. 6), сохранная экспрессия MSH2, MSH6. ИГХ-исследование показало высокий уровень экспрессии PD-L1 как в опухолевых, так и иммунных клетках. Несмотря на метастаз в регионарный лимфоузел, было принято решение о наблюдении без назначения адъювантной химиотерапии. В настоящее время 3 года безрецидивного периода.

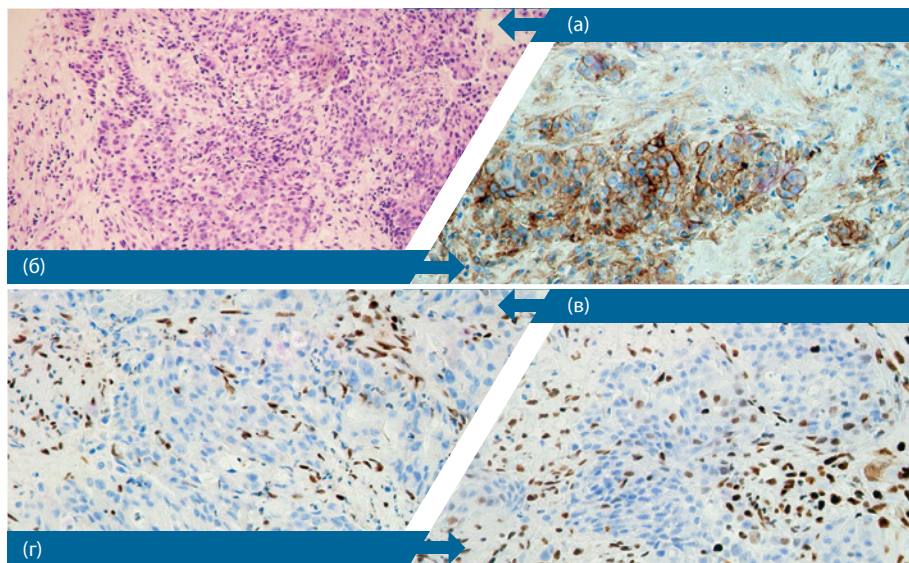
Рисунок 6. Иммуногистохимическое исследование на MLH1 (а), PMS2 (б), PD-L1 (в).



Клинико-морфологическое наблюдение 2.

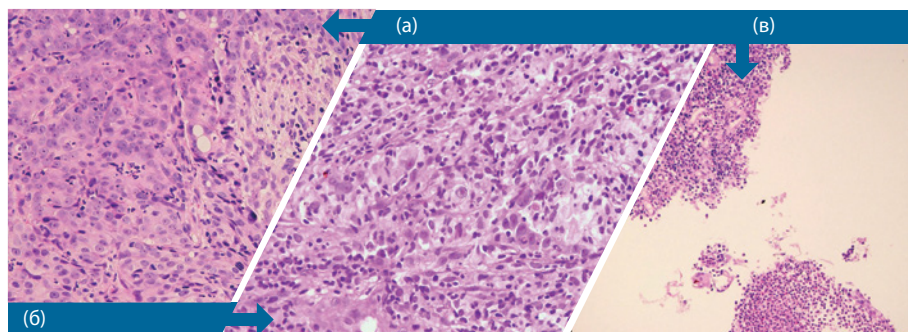
Пациент женщина 72 года. Рак желудка. На момент постановки диагноза по данным КТ Т4 (инвазия в селезенку и поджелудочную железу) N0M0. При проведении гистологического и иммуногистохимического исследования биоптата оказалось, что опухоль представляет собой низкодифференцированную аденокарциному (рис. 7а), негативную на MSH2, MSH6 (рис. 7с,d), позитивную на PMS2, MLH1. Экспрессия PD-L1 также была высокой, причем позитивная реакция отмечалась как в опухоли, так и в иммунных клетках (рис 7 б). Было принято решение о проведении анти-PD-1 терапии. После второго введения анти-PD-1 препарата отмечился подъем температуры до 39⁰С, при КТ – выявлены метастазы в лимфоузлы, очаги в печени, при ре-анализе первичной КТ они также обнаружены, но увеличились в размере. Расценено как псевдопрогрессия.

Рисунок 7. Низкодифференцированная аденокарцинома желудка (а) с высоким уровнем экспрессии PD-L1 (б) с негативной реакцией на MSH2 (в) MSH6 (г) увеличение X200.



При повторном ФЭГДС после двух введений анти-PD-1 препарата при гистологическом исследовании была выявлена значительная инфильтрация иммунными клетками, что, собственно, и объясняет «увеличение» опухолевых очагов при компьютерной томографии. После четвертого введения при гистологическом исследовании биоптата опухоль не выявлялась (рисунок 8), а отмечалась лишь инфильтрация иммунными клетками слизистой оболочки. Пациент получил анти-PD1 терапию в течении 2 лет. Опухоль и опухолеподобные изменения при ФЭГДС не выявляются, при КТ опухолевые очаги не определяются, хирургическое лечение не планируется. Пациент под наблюдением, отмечаются аутоиммунные осложнения после лечения.

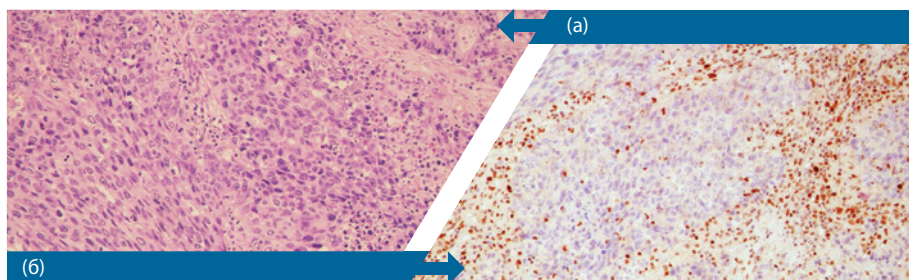
Рисунок 8. Низкодифференцированная аденокарцинома желудка: до лечения (а), после 2 введений анти-PD-1 препарата (б): отмечается выраженная инфильтрация опухоли иммунными клетками; после 4 введений анти-PD-1 препарата (в): опухолевый субстрат отсутствует, имеется только инфильтрация иммунными клетками.



Клинико-морфологическое наблюдение 3.

Пациент женщина 63 года. В конце 2018 года выполнено комплексное лечение (операция + химиотерапия), pT3N2, исследование MMR/MSI не проводилось. В апреле 2019 прогрессирование в виде метастазов по брюшине, плевре. При иммуногистохимическом исследовании выявлено выпадение экспрессии PMS2, MLH1 (рисунок 9).

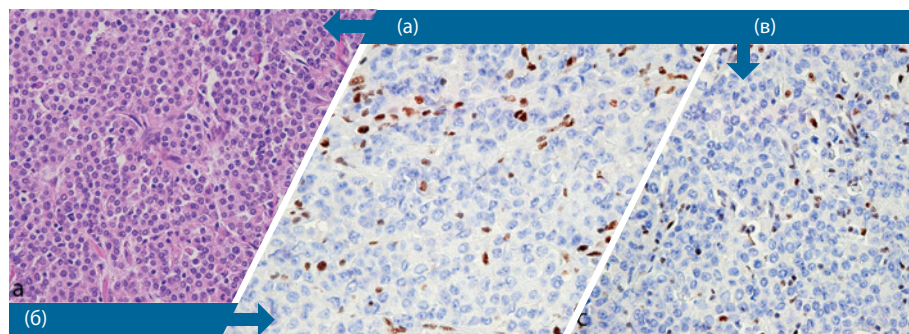
Рисунок 9. Низкодифференцированная аденокарцинома желудка с признаками dMMR/MSI-H (а). Выпадение экспрессии PMS2 (б) в опухолевых клетках.



Клинико-морфологическое наблюдение 4.

Пациент женщина 66 лет. pT4bN0M0, состояние после 2 курсов ХТ + оперативного лечения. Через 6 месяцев – метастазы в печень, брюшную полость. При иммуногистохимическом исследовании в опухоли негативная реакция на PMS2, MLH1.

Рисунок 10. Низкодифференцированная аденокарцинома желудка с признаками dMMR/MSI-H (а). Выпадение экспрессии в опухоли MLH1 (б), PMS2 (в).



ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Исследование dMMR/MSI-H имеет важное предиктивное значение при большинстве солидных опухолей. Методом выбора определения dMMR/MSI-H является иммуногистохимическое исследование MSH2, MSH6, PMS2, MLH1. Данное исследование необходимо проводить при раке желудка, толстой кишки на биопсийном материале перед планированием лечения пациента.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ:

Выберите один правильный ответ.

1. Микросателлитная нестабильность возникает в результате:

- 1) Повреждения полимеразы ДНК эpsilon (POLE).
- 2) Повреждения системы репарации неспаренных нуклеотидов ДНК (MMR).
- 3) Нарушения функции тимидилат синтазы.
- 4) Нарушения функции эксцизионной репарации ДНК (ERCC).

2. dMMR/MSI-H возможно определять следующими методами:

- 1) Иммуногистохимия.
- 2) ПЦР.
- 3) NGS.
- 4) Всем вышеперечисленным.

3. Метод, который согласно рекомендациям ESMO, должен быть использован в качестве первого для изучения микросателлитной нестабильности/ дефекта системы репарации неспаренных нуклеотидов ДНК:

- 1) Иммуногистохимия.
- 2) ПЦР.
- 3) NGS.
- 4) Жидкостная цитология.

4. Опухоли с dMMR/MSI-H чувствительны к:

- 1) Химиотерапии.
- 2) Лучевой терапии.
- 3) Иммунотерапии.
- 4) Таргетной терапии.

5. Основные гены, входящие в систему репарации неспаренных нуклеотидов ДНК (MMR):

- 1) MSH2, MSH6, PMS2, MLH1.
- 2) PMS1, PMS2, NTRK, MSH6.
- 3) MSH1, MLH1, TS, TP.
- 3) TP, TS, DPD, ERCC1.

6. Минимальное количество маркеров MMR, которое должна потерять опухоль для того, чтобы считаться dMMR/MSI-H.

- 1) 1
- 2) 2
- 3) 3
- 4) 4.

7. Минимальное количество маркеров MSI, которое должно сработать при ПЦР, чтобы опухоль считалась dMMR/MSI-H.

- 1) 1
- 2) 2
- 3) 3
- 4) 4.

8. При опухолях каких локализаций важно определять dMMR/MSI-H на биопсийном материале до планирования тактики лечения?

- 1) Плоскоклеточных раках пищевода, шейки матки.
- 2) Аденокарциномах легкого, эндометрия.
- 3) Аденокарциномах желудка, толстой кишки.
- 4) Немелкоклеточном раке легкого.

9. Рак какой локализации чаще имеет гетерогенность по статусу dMMR/MSI-H?

- 1) Эндометрия.

- 2) Толстой кишки.
- 3) Желудка.
- 4) Легкого.

10. Какой термин в настоящее время не используется для характеристики микросателлитной нестабильности?

- 1) Микросателлитная нестабильность низкой степени.
- 2) Микросателлитная нестабильность высокой степени.
- 3) Микросателлитно стабильная опухоль.
- 4) Опухоль с дефектом репарации неспаренных нуклеотидов ДНК.

11. dMMR/MSI-H аденокарцинома толстой кишки чаще всего:

- 1) Высокодифференцированная.
- 2) Умереннодифференцированная.
- 3) Низкодифференцированная.
- 4) Все ответы неверные.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ:

Номер задания	Номер ответа
1	2
2	4
3	1
4	3
5	1
6	1
7	2
8	3
9	1
10	1
11	3

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. GLOBOCAN, 2018. <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>.
2. Lindor N.M., Burgart L.J., Leontovich O., Goldberg R.M., Cunningham J.M., Sargent D.J., Walsh-Vockley C., Petersen G.M., Walsh M.D., Leggett B.A., Young J.P., Barker M.A., Jass J.R., Hopper J., Gallinger S., Bapat B., Redston M., Thibodeau S.N. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol.*, 2002., Vol. 20.: P.1043–1048. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.4.1043.
3. Ratti M., Lampis A., Hahne J.C., Passalacqua R., Valeri N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018, Volume 75, Issue 22, p. 4151–4162. DOI: 10.1007/s00018-018-2906-9.
4. Smyth E.C., Wotherspoon A., Peckitt C., Gonzalez D., Hulkki-Wilson S., Eltahir Z., Fassan M., Ruge M., Valeri N., Okines A., Hewish M., Allum W., Stenning S., Nankivell M., Langley R., Cunningham D. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the medical research council adjuvant gastric infusional chemotherapy (MAGIC) trial. *JAMA Oncol.* 2017 Sep 1;3(9):1197-1203. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.6762.
5. An J.Y., Kim H., Cheong J.H., Hyung W.J., Kim H., Noh S.H. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. *Int J Cancer*. 2012 Jul 15;131(2):505-11. DOI: 10.1002/ijc.26399.
6. Choi Y.Y., Kim H., Shin S.J., Kim H.Y., Lee J., Yang H.K., Kim W.H., Kim Y.W., Kook M.C., Park Y.K., Kim H.H., Lee H.S., Lee K.H., Gu M.J., Choi S.H., Hong S., Kim J.W., Hyung W.J., Noh S.H., Cheong J.H. Microsatellite instability and programmed cell death-ligand 1 expression in stage II/III gastric cancer: post hoc analysis of the CLASSIC randomized controlled study. *Ann Surg*. 2019;270(2):309-316. DOI: 10.1097/SLA.0000000000002803.
7. Janjigian Y.Y., Sanchez-Vega F., Jonsson P., Chatila W.K., Hechtman J.F., Ku G.Y., Riches J.C., Tuvy Y., Kundra R., Bouvier N., Vakiani E., Gao J., Heins Z.J., Gross B.E., Kelsen D.P., Zhang L., Strong V.E., Schattner M., Gerdes H., Coit D.G., Bains M., Stadler Z.K., Rusch V.W., Jones D.R., Molena D., Shia J., Robson M.E., Capanu M., Middha S., Zehir A., Hyman D.M., Scaltriti M., Ladanyi M., Rosen N., Ilson D.H., Berger

M.F., Tang L., Taylor B.S., Solit D.B., Schultz N. Genetic predictors of response to systemic therapy in esophagogastric cancer. *Cancer Discov.* 2018 Jan;8(1):49-58. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0787.

8. Le D.T., Durham J.N., Smith K.N., Wang H., Bartlett B.R., Aulakh L.K., Lu S., Kemberling H., Wilt C., Luber B.S., Wong F., Azad N.S., Rucki A.A., Laheru D., Donehower R., Zaheer A., Fisher G.A., Crocenzi T.S., Lee J.J., Greten T.F., Duffy A.G., Ciombor K.K., Eyring A.D., Lam B.H., Joe A., Kang S.P., Holdhoff M., Danilova L., Cope L., Meyer C., Zhou S., Goldberg R.M., Armstrong D.K., Bever K.M., Fader A.N., Taube J., Housseau F., Spetzler D., Xiao N., Pardoll D.M., Papadopoulos N., Kinzler K.W., Eshleman J.R., Vogelstein B., Anders R.A., Diaz L.A. Jr. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017. 357(6349):409-413. doi: 10.1126/science.aan6733.

9. Bang Y.J., Van Cutsem E., Fuchs C.S., Ohtsu A., Tabernero J., Ilson D.H., Hyung W.J., Strong V.E., Goetze T.O., Yoshikawa T., Tang L.H., Hwang P.M.T., Webb N., Adelberg D., Shitara K. KEYNOTE-585: Phase III study of perioperative chemotherapy with or without pembrolizumab for gastric cancer. *Future Oncol.* 2019;15(9):943-952. doi: 10.2217/fon-2018-0581.

10. Rasmussen L., Arvin A. Chemotherapy-induced immunosuppression. *Environ Health Perspect.* 1982; 43: 21–25. doi: 10.1289/ehp.824321.

11. Бесова Н. С., Бяхов М. Ю., Константинова М. М., Лядов В. К., Тер-Ованесов М. Д., Трякин А. А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака желудка. Злокачественные опухоли. Том 8, №3, 2018, спецвыпуск 2, С. 273-288. DOI:10.18027/2224–5057–2018–8–3s2–273–288.

12. Kim J.Y., Shin N.R., Kim A., Lee H.J., Park W.Y., Kim J.Y., Lee C.H., Huh G.Y., Park D.Y. Microsatellite instability status in gastric cancer: a reappraisal of its clinical significance and relationship with mucin phenotypes. *Korean J Pathol.* 2013. 47(1):28-35. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2013.47.1.28.

13. Warneke V.S., Behrens H.M., Haag J., Balschun K., Böger C., Becker T., Ebert M.P., Lordick F., Röcken C. Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine. *Diagn Mol Pathol.* 2013. 22(3):127-37. doi:10.1097/PDM.0b013e318284188e.

14. Tabernero J., Van Cutsem E., Bang Y.-J., et al. Pembrolizumab with or without chemotherapy versus chemotherapy for advanced gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) adenocarcinoma: The phase III KEYNOTE-062 study. *J Clin Oncol* 37, 2019.



ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СЛУЖБА МИБС:

— это качественные иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования опухолей для нужд клинических онкологов, назначающих и корректирующих таргетную терапию и иммунотерапию.

Пять причин начать сотрудничество с МИБС уже сегодня:

- весь спектр методов (ИГХ, ПЦР, FISH, NGS) с рекомендацией оптимальной тактики исследования;
- современное оборудование в собственной лаборатории при Онкологической клинике МИБС в Санкт-Петербурге;
- берем логистику на себя - препараты для исследований принимаются в любом из почти 90 региональных Диагностических центров МИБС в РФ;
- большинство исследований может быть выполнено не только на платной основе, но и за счет средств ОМС без привязки к региону;
- минимальные сроки (ИГХ/ПЦР/FISH - 7 дней, NGS - 28 дней) с получением заключения сразу после его готовности (каналами электронной связи).

КАКИЕ ДОКУМЕНТЫ НУЖНЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗА СЧЕТ ОМС?

Для проведения иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования необходимо вместе с гистологическими препаратами (“стекла”) и/или парафиновыми блоками с опухолью передать в любой из диагностических центров сети МИБС:

1. Оригинал направления по форме 14У МЗ РФ с обозначением направляющего учреждения в верхней части направления (прямоугольная печать), и треугольной или круглой печатью внизу (приложение).
2. Форма 57 также возможна, но не включает пересмотр препаратов.
3. Копию полиса ОМС с обеих сторон.
4. Копию СНИЛС.
5. Копию паспорта (основная страница и регистрации).
6. Копию выписки из истории болезни (эпикриза) и/или любых других документов с клинической информацией о заболевании.

**ПОЛУЧИТЬ КОНСУЛЬТАЦИЮ ИЛИ ОТВЕТЫ НА ЛЮБЫЕ ВОПРОСЫ
О СОТРУДНИЧЕСТВЕ С МИБС В ВОПРОСАХ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МОЖНО ПО ТЕЛЕФОНУ:
+7 (812) 244-06-31**

Вместе с МИБС современная диагностика доступна и в регионах!

ДЛЯ ЗАМЕТОК