



Вопросы тестирования и гетерогенности MMR/MSI в опухолях женской репродуктивной системы

Раскин Г.А.

Зав. отделением патологической анатомии МИБС, д.м.н., проф. кафедры
онкологии СПбГУ

22.10.2021

Москва

Информация предоставлена в качестве информационной и образовательной поддержки врачей. Мнения, высказанные на слайдах и в выступлении, отражают точку зрения докладчиков, которая не обязательно отражает точку зрения компании MSD (Merck & Co., Inc., Кенилворс, Нью-Джерси, США).

MSD не рекомендует применять свои препараты способами, отличными от описываемых в инструкции по применению.

В связи с различиями в требованиях регулирующих инстанций в разных странах, зарегистрированные показания и способы применения препаратов, упоминающихся в данной презентации, могут различаться.

Перед назначением любых препаратов, пожалуйста, ознакомьтесь с локальными инструкциями по медицинскому применению, предоставляемыми компаниями-производителями.

Полные инструкции по медицинскому применению доступны по запросу.

Информация о раскрытии финансовой заинтересованности.

Настоящим лектор подтверждает, что он(а) получает гонорары за консультационные услуги в области научной и педагогической деятельности (образовательные услуги, научные статьи, участие в экспертных советах, участие в исследованиях и др.) от следующих компаний: MSD. Данная презентация поддерживается компанией MSD.

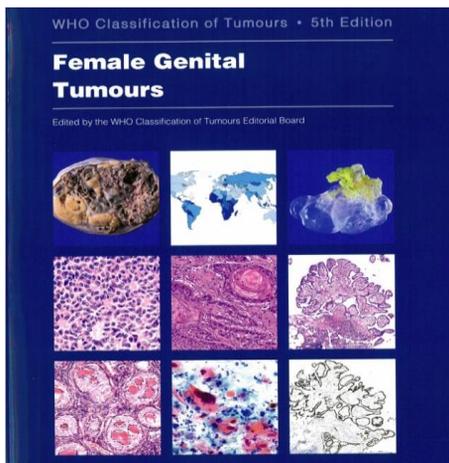
Показание к иммунотерапии

23 мая 2017 года FDA зарегистрировала показание к иммунотерапии: любая солидная опухоль с нарушением MMR или с микросателлитной нестабильностью высокой степени.

1 марта 2019 г.: анти-PD1 терапия показана для лечения пациентов с распространенными злокачественными новообразованиями с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H), включая нарушение системы репарации ДНК (dMMR), которые ранее получали терапию.

RU-KEY-00886.02.2021

Классификация рака эндометрия



WHO, 2020

WHO classification of tumours of the uterine corpus

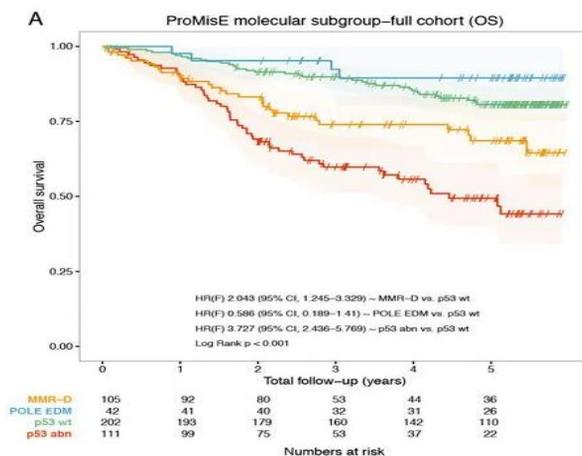
Endometrial epithelial tumours and precursors		8897/1	Smooth muscle tumour of uncertain malignant potential
8380/2	Endometrial hyperplasia without atypia	8891/1*	Epithelioid smooth muscle tumour of uncertain malignant potential
8380/3	Endometrial hyperplasia of the endocervix	8896/1*	Myoid smooth muscle tumour of uncertain malignant potential
	Endometrioid adenocarcinoma NOS		Spindle smooth muscle tumour of uncertain malignant potential
	POLE-ultramutated endometrioid carcinoma		Leiomyosarcoma NOS
	Mismatch repair-deficient endometrioid carcinoma	8898/1	Metastasizing leiomyoma
	p53-mutant endometrioid carcinoma	8890/3	Leiomyosarcoma NOS
	No specific molecular profile (NSMP) endometrioid carcinoma		Spindle leiomyosarcoma
8441/3	Serous carcinoma NOS	8891/3	Epithelioid leiomyosarcoma
8310/3	Clear cell adenocarcinoma NOS	8896/3	Myoid leiomyosarcoma
8020/3	Carcinoma, undifferentiated, NOS	8930/0	Endometrial stromal nodule
8323/3	Mixed cell adenocarcinoma	8931/3	Endometrial stromal sarcoma, low grade
9110/3	Mesonephric adenocarcinoma	8930/3	Endometrial stromal sarcoma, high grade
8070/3	Squamous cell carcinoma NOS	8650/3	Undifferentiated sarcoma
8144/3	Mucinous carcinoma, intestinal type	8590/1	Uterine tumour resembling ovarian sex cord tumour
9111/1*	Mesonephric-like adenocarcinoma	8714/0	Perivascular epithelioid tumour, benign
8890/3	Carcinosarcoma NOS	8714/3	Perivascular epithelioid tumour, malignant
		852/1	Inflammatory myofibroblastic tumour
			Epithelioid myofibroblastic sarcoma
Tumour-like lesions		Mixed epithelial and mesenchymal tumours	
	Endometrial polyp	8932/0	Adenomyoma NOS
	Endometrial metaplasia	8932/0	Atypical polypoid adenomyoma
	Arias-Stella reaction	8933/3	Adenosarcoma
Mesenchymal tumours specific to the uterus		Miscellaneous tumours	
8890/0	Leiomyoma NOS	9473/3	Primitive neuroectodermal tumour NOS
8890/0	Lipoleiomyoma	9064/3	Demm cell tumour NOS
8890/0	Leiomyoma, apoplectic	9071/3	Yolk sac tumour NOS
8890/0	Leiomyoma, hydropic	9080/0	Mature teratoma NOS
8890/0	Dissecting leiomyoma	9080/3	Immature teratoma NOS
8890/0	Cellular leiomyoma		
8896/0	Myoid leiomyoma		
8891/0	Epithelioid leiomyoma		
8893/0	Symphysial leiomyoma		
8890/1	Leiomyomatosis NOS		
8890/1	Intravenous leiomyomatosis		

Особенности молекулярных подтипов рака эндометрия

	POLE-ультрамутантный	MMR-дефицитный	P53-мутантный	Неспецифический молекулярный подтип
Гистологические особенности	Часто high-grade гистология, высокое содержание TILs	Часто high-grade гистология, высокое содержание TILs	Преимущественно high-grade гистология с диффузной ядерно-цитоплазматической атипией. Железистые и солидные формы.	Преимущественно low-grade гистология, часто с плоскоклеточной дифференцировкой. Отсутствие TILs.
Диагностический тест	NGS/ Секвенирование по Сэнгеру/ ПЦП горячих точек: p.Pro286Arg, p.Val411Leu, p.Ser297Phe, p.Ala456Pro, p.Ser459Phe.	MMR-иммуногистохимия: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2; MSI ПЦП; NGS.	Иммуногистохимия p53.	MMR-профитит, p53 дикого типа, отсутствие патогенных мутаций POLE.
Клинические особенности	Молодой возраст	Может быть ассоциировано с синдромом Линча	Часто манифестация на поздних стадиях	Часто высокий индекс массы тела
Прогноз	Отличный	Промежуточный	Плохой	От промежуточного к отличному

WHO, 2020

Общая выживаемость в зависимости от молекулярного подтипа рака эндометрия



McAlpine J. et al., 2016

ESGO/ESTRO/ESP рекомендации 2020 г. Молекулярная классификация рака эндометрия.

- Молекулярная классификация рекомендуется во всех случаях рака эндометрия, в особенности в случаях высокой степени злокачественности (high grade).
- Мутация POLE может не исследоваться в случаях рака эндометрия с низким и промежуточным риском с гистологией низкой степени злокачественности (low grade).

Concin N. et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. Int J Gynecol Cancer 2020;0:12–39.

Значение молекулярной классификации в стратификации групп риска

Risk group	Molecular classification unknown	Molecular classification known†
Low	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage IA endometrioid + low-grade‡ + LVSI negative or focal 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage I-II POLEmut endometrial carcinoma, no residual disease ▶ Stage IA MMRd/NSMP endometrioid carcinoma + low-grade‡ + LVSI negative or focal
Intermediate	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage IB endometrioid + low-grade‡ + LVSI negative or focal ▶ Stage IA endometrioid + high-grade‡ + LVSI negative or focal ▶ Stage IA non-endometrioid (serous, clear cell, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, mixed) without myometrial invasion 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage IB MMRd/NSMP endometrioid carcinoma + low-grade‡ + LVSI negative or focal ▶ Stage IA MMRd/NSMP endometrioid carcinoma + high-grade‡ + LVSI negative or focal ▶ Stage IA p53abn and/or non-endometrioid (serous, clear cell, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, mixed) without myometrial invasion
High-intermediate	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage I endometrioid + substantial LVSI regardless of grade and depth of invasion ▶ Stage IB endometrioid high-grade‡ regardless of LVSI status ▶ Stage II 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage I MMRd/NSMP endometrioid carcinoma + substantial LVSI regardless of grade and depth of invasion ▶ Stage IB MMRd/NSMP endometrioid carcinoma high-grade‡ regardless of LVSI status ▶ Stage II MMRd/NSMP endometrioid carcinoma
High	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage III–IVA with no residual disease ▶ Stage I–IVA non-endometrioid (serous, clear cell, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, mixed) with myometrial invasion, and with no residual disease 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage III–IVA MMRd/NSMP endometrioid carcinoma with no residual disease ▶ Stage I–IVA p53abn endometrial carcinoma with myometrial invasion, with no residual disease ▶ Stage I–IVA NSMP/MMRd serous, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma with myometrial invasion, with no residual disease
Advanced metastatic	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage III–IVA with residual disease ▶ Stage IVB 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Stage III–IVA with residual disease of any molecular type ▶ Stage IVB of any molecular type

Наличие мутации POLE меняет промежуточную-высокую группу риска на низкую.

Concin N. et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. Int J Gynecol Cancer 2020;0:12–39.

Нужна ли морфологическая классификация в эру молекулярной?

IS MICROSCOPIC EXAMINATION USEFUL IN THE TIMES OF MOLECULAR CLASSIFICATION OF ENDOMETRIAL CARCINOMA?

Poor reproducibility in high grade EC

Subtype	Percentage
EEC 1,2	70%
EEC 3	17%
SC	10%
other (Undiff, Mixed, Clear, Cell)	3%

Xavier Matias-Guiu

European Society of Pathology 33rd European Congress of Pathology 29 - 31 August 2021

P53 – мутантный рак эндометрия

Original Article

Equivalent Survival of p53 Mutated Endometrial Endometrioid Carcinoma Grade 3 and Endometrial Serous Carcinoma

Mary Anne Brett, M.D., Eshetu G. Atenafu, Ph.D., Nilanchali Singh, M.D., Prafull Ghatage, M.D., Blaise A. Clarke, M.D., Gregg S. Nelson, M.D., Ph.D., Marcus Q. Bernardini, M.D., and Martin Köbel, M.D.

There was no significant difference in survival between ESC and p53 mutated EEC3 in multivariable analysis.

Although this is so, separate classification should continue due to biological differences that will become important for future targeted therapy.

Xavier Matias-Guiu

European Society of Pathology 33rd European Congress of Pathology 29 - 31 August 2021

MMR

- Основные белки: MSH2, MSH6, PMS2, MLH1.
- Функционируют в виде димеров: MSH2-MSH6, PMS2-MLH1. При нарушении MSH6 деградирует MSH2, при нарушении PMS2 разрушается MLH1, но не наоборот.
- Возможно проводить иммуногистохимическую оценку.

Beirne J.P. et al., 2015

Необходимость тестирования MMR/MSI в раке эндометрия

1. Диагностическое значение: dMMR/MSI-H считается признаком эндометриоидной аденокарциномы эндометрия (относительно других аденокарцином эндометрия).
2. Пре-скрининг для идентификации пациентов с высоким риском синдрома Линча.
3. Прогностическое значение, т.к. dMMR/MSI-H молекулярный тип рака тела матки отличается лучшим прогнозом.
4. Предиктивное значение, как маркер чувствительности к иммунотерапии.

Concin N. et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. Int J Gynecol Cancer 2020;0:12–39.

Методы, используемые для исследования MMR/MSI. Рекомендации ESMO 2019.

- Иммуногистохимия MSH2, MSH6, PMS2, MLH1. dMMR, если один из маркеров выпал.
- ПЦР: D5S346, D2S123, D17S250, BAT25, BAT26 или BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27. MSI-H, если ≥ 2 маркеров срабатывают.
- NGS: альтернативный метод исследования, позволяющий одновременно определить MSI и мутации в генах MMR.

C. Luchini, F. Bibeau, M. J. L. Ligtenberg, N. Singh, A. Nottegar, T. Bosse, R. Miller, N. Riaz, J.-Y. Douillard, F. Andre, A. Scarpa. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. Annals of Oncology 30: 1232–1243, 2019

Сравнительная характеристика методов определения dMMR/MSI-H

Метод исследования	Иммуногистохимия	ПЦР	NGS
Определяемый параметр	MMR	MSI	MSI и мутации генов MMR
Покрытие ОМС	Да	Нет	Нет
Скорость исследования	Высокая	Высокая	Низкая
Возможность определения POLE	Нет	Нет	Есть
Возможность определения гетерогенности опухолей	Да	Нет	Нет
			Мнение автора

Рекомендации ESMO 2019 в определении dMMR/MSI-H

- Первый метод, который должен быть использован для исследования MMR/MSI- это иммуногистохимия.
- В случае сомнительных результатов при иммуногистохимии необходимо использовать ПЦР метод.
- В случае подбора иммунотерапии лучше использовать оба метода.
- MSI-low термин не должен использоваться, данная группа относится к MSS.

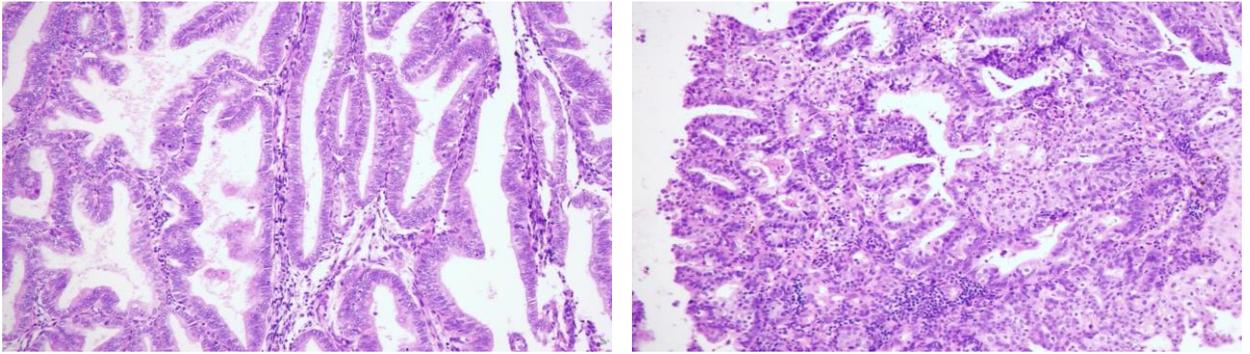
C. Luchini, F. Bibeau, M. J. L. Ligtenberg, N. Singh, A. Nottegar, T. Bosse, R. Miller, N. Riaz, J.-Y. Douillard, F. Andre, A. Scarpa. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Annals of Oncology* 30: 1232–1243, 2019

Нарушение MMR в раке эндометрия (I типа).

- 27% (83 из 308).
- По данным литературы 15-28% рака эндометрия (Kaniopiene D. et al., *Medicina.*, 2014; Goodfellow P.J. et al., *Int J Gynec Cancer.*, 2005).
- Преобладает выпадение PMS2-MLH1: 71% (27 из 38). Выпадение MSH2-MSH6: 18% (7 из 38). 2 случая - выпадение PMS2 и MSH6, 2 случая – только MSH6.

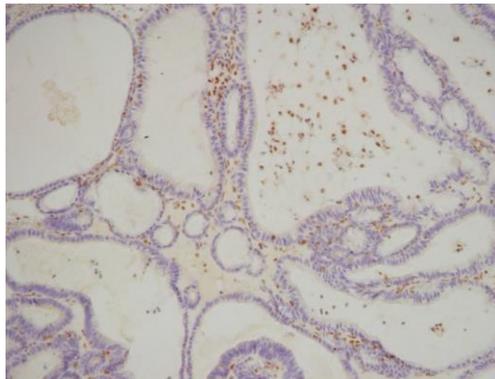
Собственные данные (РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова)

Эндометриоидная аденокарцинома эндометрия. Гистология MMR-дефективной опухоли



Микрофотографии из личного архива

Иммуногистохимическое исследование MMR. Опухоль считается dMMR/MSI-H, если экспрессия одного и более маркеров отсутствует.

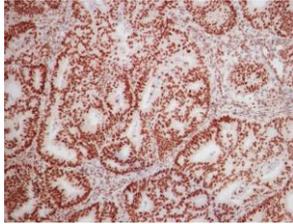


Выпадение экспрессии PMS2

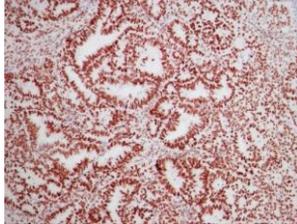
Опухоль с dMMR/MSI-H. Синее окрашивание ядер опухолевых клеток гематоксилином означает утрату белка MMR, что является признаком ее дефицита.

Микрофотография из личного архива

Иммуногистохимическое исследование MMR. Опухоль pMMR/MSS (без dMMR/MSI-H), если все белки MMR сохранены в опухоли.

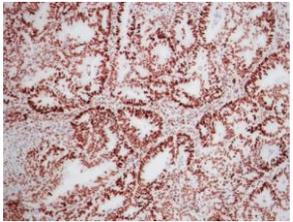


Сохранная экспрессия MSH2

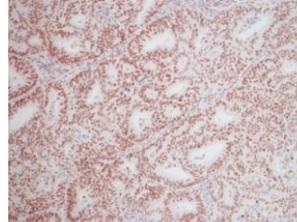


Сохранная экспрессия MSH6

Опухоль с pMMR/MSS (без dMMR/MSI-H).
Все 4 маркера демонстрируют экспрессию.



Сохранная экспрессия MLH1



Сохранная экспрессия PMS2

Микрофотографии из личного архива

Примеры заключения

1. Результаты иммуногистохимии: Негативная реакция в опухоли на PMS2, MLH1, позитивная реакция на MSH6, MSH2.

Заключение:

Эндометриоидная аденокарцинома эндометрия с dMMR/MSI-H.

2. Результаты иммуногистохимии: Позитивная реакция в опухоли на MSH6, MSH2, PMS2, MLH1.

Заключение:

Эндометриоидная аденокарцинома эндометрия без dMMR/MSI-H (pMMR/MSS).

Мнение докладчика

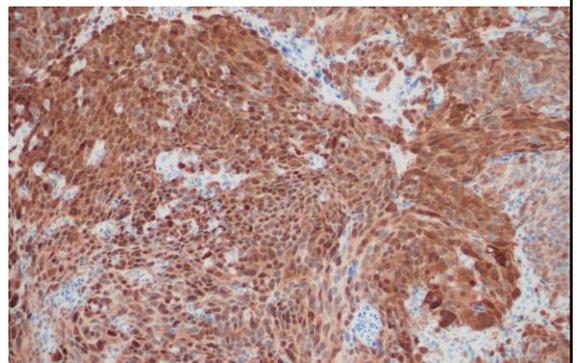
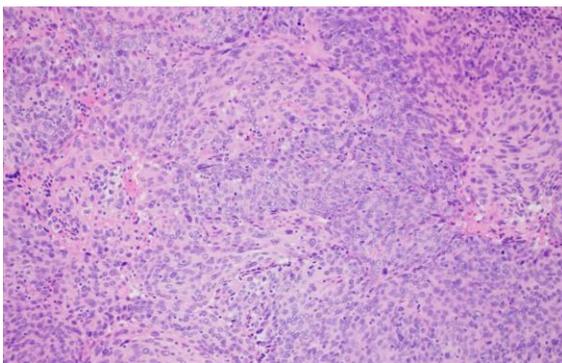
Ошибки в интерпретации исследований

Макроскопическое описание: PD-L1 (лиганд PD1, RMAb, Clone ZR3, CellMarque, RTU) - Реакция на клетках опухоли и на мононуклеарах иммунной системы (MIC) отрицательная.
 Реакция на мутантный белок гена MLH1 (MMAb, Clone GM011, ПраймБиоМед, RTU) - положительная в 95% клеток опухоли (см. фото 1. Ув.400х).
 Реакция на мутантный белок гена MSH2 (MMAb, Clone G219-1129, CellMarque, RTU) - положительная в 15% клеток опухоли.
 Реакция на мутантный белок гена MSH6 (MMAb, Clone 44, CellMarque, RTU) - положительная в 20% клеток опухоли (см. фото 2. Ув.400х).
 Реакция на мутантный белок гена PMS2 (MMAb, Clone MRQ-28, CellMarque, RTU) - положительная в 10% клеток опухоли.
 Her2/neu (c-erbB-2/Her-2/neu, RMAb, Clone SP3, NeoMarkers for LabVision, RTU) - Отсутствие мембранного окрашивания. Количественная оценка - 0.

Патогистологическое заключение (диагноз): Умеренно дифференцированная аденокарцинома толстой кишки с выраженными признаками микросателлитной нестабильности (положительные реакции MLH1 в 95% клеток опухоли, MSH2 в 15% клеток опухоли, MSH6 в 20% клеток опухоли, PMS2 в 10% клеток опухоли), отсутствием экспрессии рецепторов белка PD-L1 (TPS 0%, CPS 0.0) и Her-2/neu.

MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 – это нормальные (а не мутантные) белки системы репарации, которые при сохранной функции MMR находятся в ядре клетки и красятся при иммуногистохимическом исследовании. Поэтому окраска на все 4 маркера означает сохранную функцию MMR, а не dMMR/MSI-H, как обозначено в данном заключении.

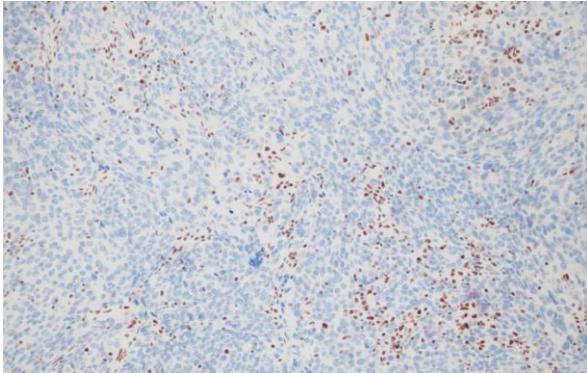
Рак шейки матки с dMMR/MSI-H



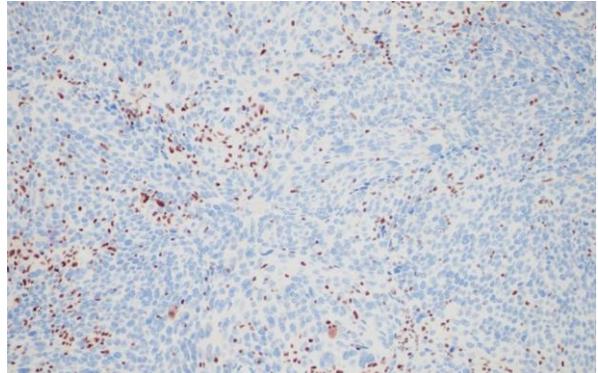
P16

Микрофотографии из личного архива

Рак шейки матки с dMMR/MSI-H



PMS2



MLH1

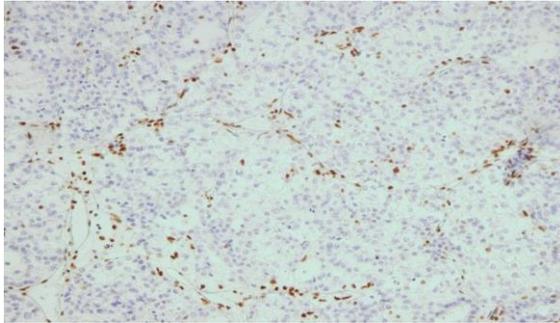
Микрофотографии из личного архива

Нарушение MMR при эндометриоидной аденокарциноме яичника в сравнении с эндометриоидной аденокарциномой тела матки

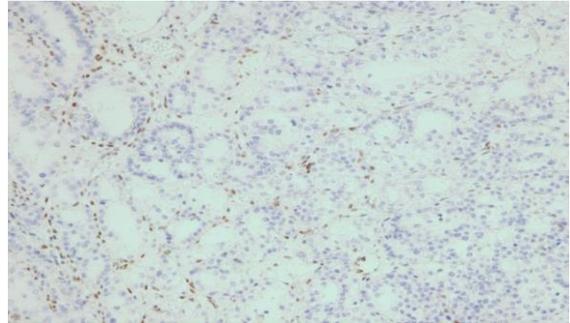
- 7% (2 из 28) при эндометриоидном раке яичника. Оба случая сопровождались пограничной эндометриоидной опухолью с dMMR/MSI-H.
- 27% (83 из 308) при эндометриоидном раке тела матки. Атипичная гиперплазия эндометрия имела dMMR/MSI-H в 3% случаев.

Собственные данные

Светлоклеточный рак яичника



MSH6



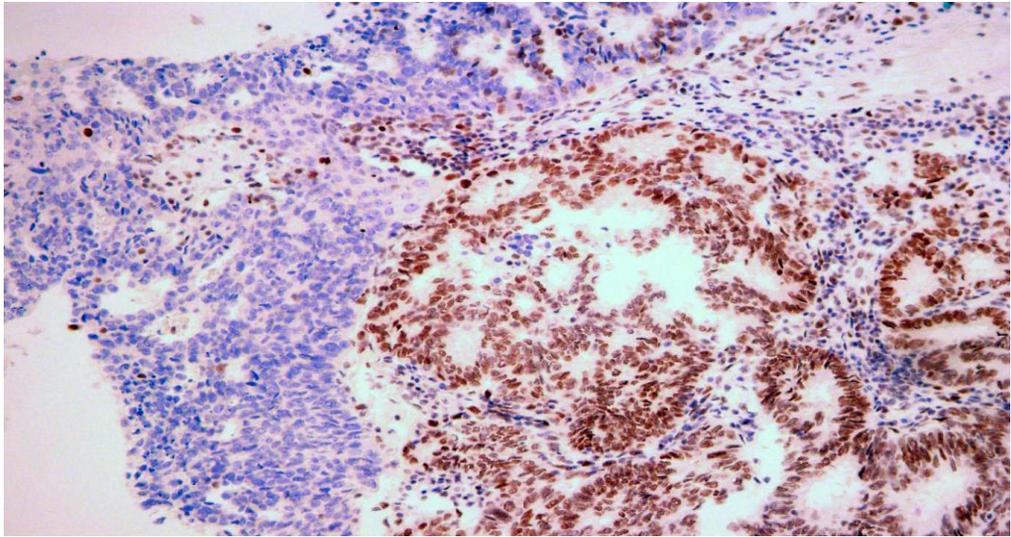
MSH2

Собственные данные

Нарушение MMR при эндометриоидной аденокарциноме яичника в сравнении с эндометриоидной аденокарциномой тела матки

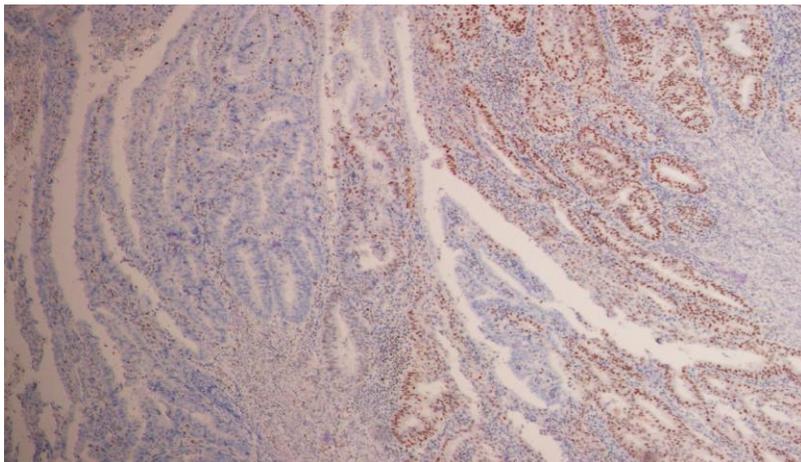
- Большинство спорадических dMMR/MSI-H рака эндометрия из-за гиперметилирования MLH1 (Hampel, 2006; Stelloo, 2017).
- Гиперметилирование MLH1- редкое событие при эндометриоидной аденокарциноме яичника (WHO, 2020).
- В 50% случаев dMMR/MSI-H рака яичника был связан с синдромом Линча (Hodan R. et al. Cancer Med., 2021).

Гетерогенность dMMR при раке эндометрия



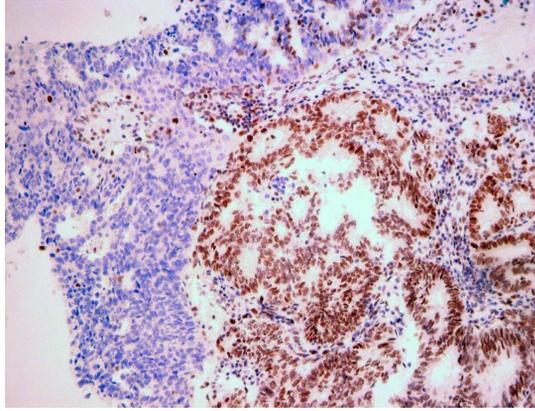
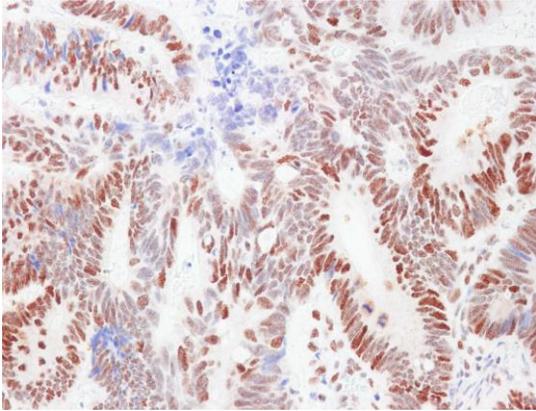
PMS2. Микрофотография из личного архива

MMR при раке эндометрия: два клона клеток



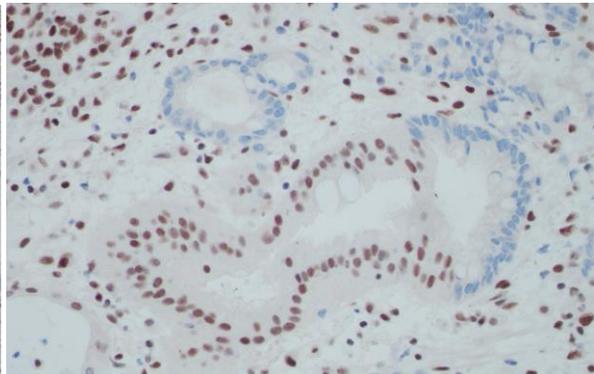
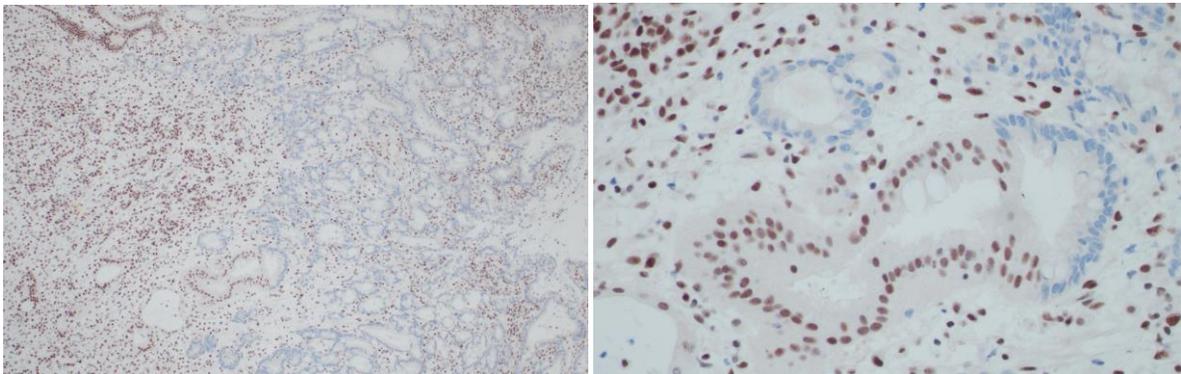
MSH6. Микрофотография из личного архива

Истинная гетерогенность Vs ложная



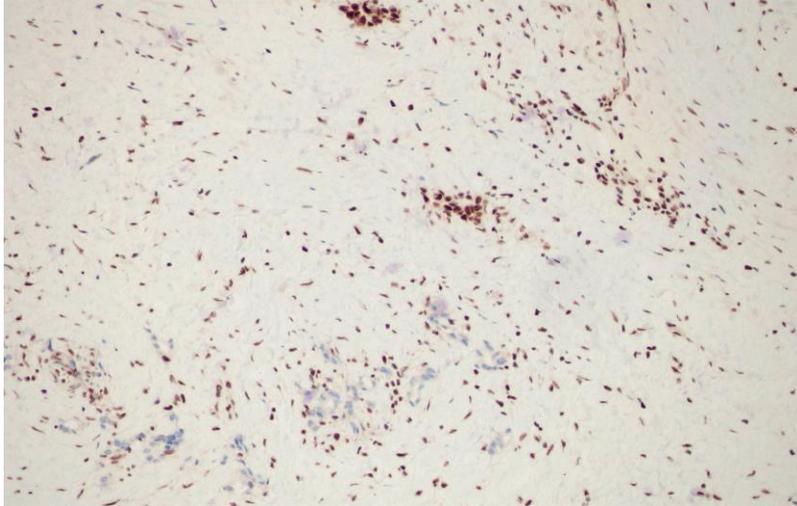
PMS2. Микрофотографии из личного архива

Гетерогенность dMMR/MSI-H. PMS2.



PMS2. Микрофотографии из личного архива

Гетерогенность dMMR/MSI-H. Метастаз

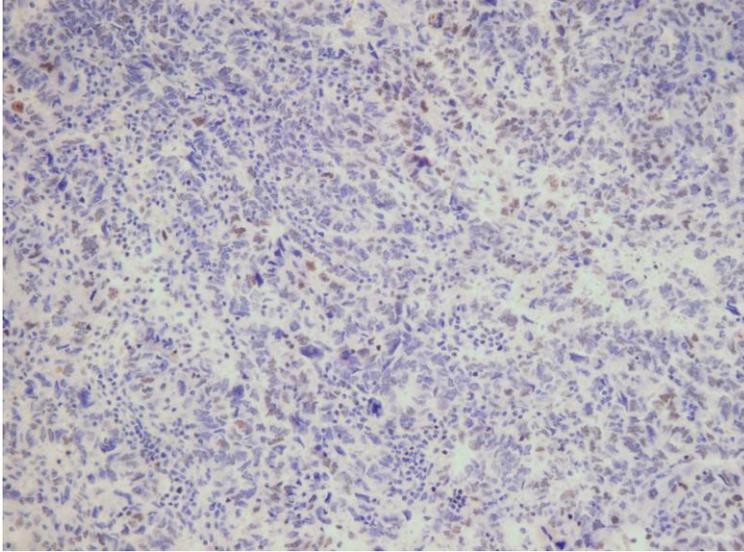


PMS2. Микрофотографии из личного архива

Гетерогенность dMMR/MSI-H при раке эндометрия

- **4% по нашим данным (МИБС: 12 из 308).**
- <3% случаев эндометриоидного и недифференцированного рака эндометрия.
- В большинстве случаев сопровождается гетерогенной MSI-H.
- Нет определенных данных как это расценивать, однако рекомендации ESMO предполагают, что такие случаи могут быть интерпретированы как dMMR/MSI-H.

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



MSH2. Микрофотография из личного архива

Фиксация материал

- 10 % буферный формалин: 1 часть 40% формальдегида (100% формалин) + 9 частей буфера (трис, фосфат). Недопустима нейтрализация формалина щелочами!
- Время фиксации 24 часа (72 часа – критическое значение)
- Толщина куска не должна превышать 1 см.
- Материал должен погружаться в формалин в минимальные сроки (не более 3 часов – для операционного, не более 30 мин – биопсия).
- Вырезку материала желательно проводить на сыром материале, если это невозможно, то материал должен быть разрезан («раскрыт») до толщины 1 см.
- Соотношение материала и формалина должно быть не менее 1: 10.

Резюме:

- Метод выбора в исследовании MMR/MSI при раке эндометрия, яичника, редких локализациях – иммуногистохимия (или NGS).
- Гетерогенность опухоли, в том числе, по dMMR/MSI-H – важный феномен, усложняющий тактику ведения пациентов.
- В случае прогрессирования рака эндометрия необходимо исследование MMR/MSI на рецидивном (метастатическом) материале.

Спасибо за внимание!