

Синдром Линча

- Это аутосомно-доминантное расстройство в результате которого наблюдаются нарушения в строении генов системы репарации днк: MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2
- Выявляется в 3,1-3,8% случаев КРР, в 2-6% случаев рака эндометрия, при опухолях верхних отделов ЖКТ и мочевыделительной системы

WHO Classification of Tumors Digestive system tumors, <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/31/231>; Hampel H, Frankel WL, Martin E et al (2008) Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.5950>; Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS et al (2017) Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 35(10):1086–1095. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0012>

MSI и морфология опухоли

- Большинство опухолей с статусом MSI выявляются на более ранних стадиях (1-2 стадия заболевания), чем опухоли с MSS
- Чаще это правая сторона толстой кишки
- Нередко опухоль не только обладает микросателлитной нестабильностью, но и мутацией гена BRAF

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Value of Mismatch Repair, KRAS, and BRAF Mutations in Predicting Recurrence and Benefits From Chemotherapy in Colorectal Cancer

Gordon Hutchins, Katie Southward, Kelly Handley, Laura Magill, Claire Bonamont, Jens Stahlschmidt, Susan Richman, Philip Chambers, Matthew Seymour, David Kerr, Richard Gray, and Philip Quirke

ABSTRACT

Purpose: It is uncertain whether modest benefits from adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer justify the toxicity, cost, and inconvenience. We investigated the usefulness of defective mismatch repair (dMMR), BRAF, and KRAS mutations in predicting tumor recurrence

Imaging, Diagnosis, Prognosis

Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis

Piero Benatti,¹ Roberta Gafà,³ Daniela Barana,⁵ Massimiliano Marino,¹ Alessandra Scarselli,¹ Monica Pedroni,¹ Iva Maestri,³ Laura Guerzoni,³ Luca Roncucci,¹ Mirco Menigatti,¹ Barbara Roncarì,¹ Stefania Maffei,¹ Giuseppina Rossi,¹ Giovanni Ponti,¹ Alessandra Santini,⁴ Lorena Losi,² Carmela Di Gregorio,⁶ Cristina Oliani,⁷ Maurizio Ponz de Leon,¹ and Giovanni Lanza³

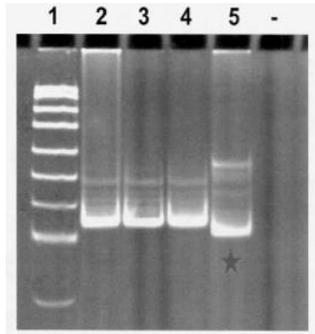
Abstract Purpose: Many studies have evaluated the role of high levels of microsatellite instability (MSI) as a prognostic marker and predictor of the response to chemotherapy in colorectal cancer (CRC); however, the results are not conclusive. The aim of this study was to analyze the prognostic significance of high levels of MSI (MSI-H) in CRC patients in relation to fluorouracil-based chemotherapy.

Experimental Design: In three different institutions, 1,263 patients with CRC were tested for the presence of MSI and BRAF, and their survival was then analyzed in relation to MSI status. Chem-

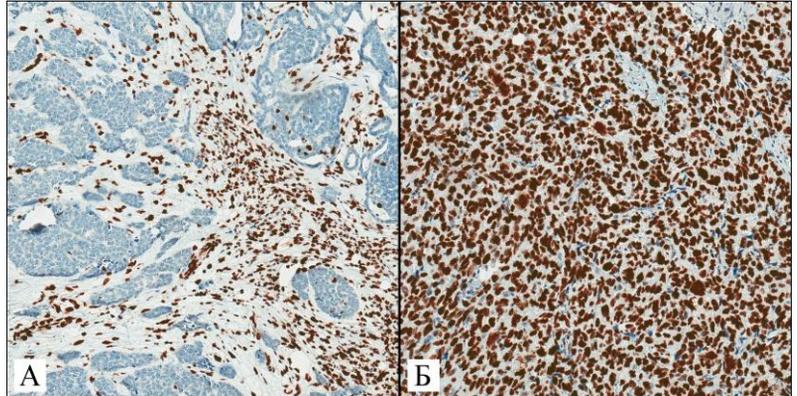
Определение микросателлитной нестабильности

• Генетические методы:

- ПЦР
- NGS



• Иммуногистохимический метод



Корнилов А.В. Автореферат. Молекулярно-генетическая диагностика наследственного рака толстой кишки. Санкт-Петербург. 2012; Кузнецова О.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Виноградов М.И., Шюмова М.В., Франк Г.А. Иммуногистохимическое исследование маркеров MSI при раке молочной железы. Архив патологии. 2021;83(1):12–17. <https://doi.org/10.17116/ptol2021830112>

На сколько равнозначны эти методы?

Malaysian J Pathol 2019; 41(2) : 91 – 100

ORIGINAL ARTICLE

Screening for microsatellite instability in colorectal carcinoma: practical utility of immunohistochemistry and PCR with fragment analysis in a diagnostic histopathology setting

Phaik-Leng CHEAH¹, Jing LI¹, Lai-Meng LOOI¹, Cing-Chai KOH¹, Tze-Pheng LAU¹, Siow-Wee CHANG², Kean-Hooi TEOH¹, Keim-Seong MUN¹, Abdul Rahman NAZARINA³

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, ²Genomic Medical Science@UM, Faculty of Medicine and ³Institute of Biological Sciences, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

Abstract

Since 2014, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) has recommended that colorectal carcinoma (CRC) be universally tested for high microsatellite instability (MSI-H) which is present

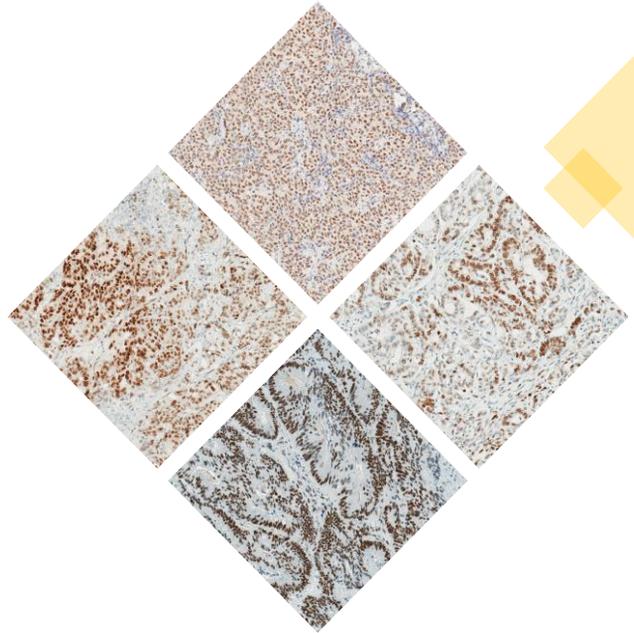
- Согласно рекомендациям NCCN оба метода считаются оптимальными для скрининга

- ИГХ – 11/73 (15,1%)
- ПЦР – 12/73 (16,4%)

Cheah PL, Li J, Looi LM, et al. Screening for microsatellite instability in colorectal carcinoma: Practical utility of immunohistochemistry and PCR with fragment analysis in a diagnostic histopathology setting. *Malays J Pathol.* 2019;41(2):91-100.

Иммуногистохимический метод

- MutL Protein Homolog 1 (**MLH1**)
- MutS Protein Homolog 2 (**MSH2**)
- MutS Protein Homolog 6 (**MSH6**)
- Postmeiotic Segregation Increased 2 (**PMS2**)



Из архива Центра контроля качества иммуногистохимических исследований

MSI - IHC при колоректальном раке: Мы с MLH1 ходим парой!

- Каждый гетеродимер – это комплекс из 2 белков:
- MLH1-PMS2, MSH2-MSH6.
Качественный результат ИГХ (+ / -)
- Отсутствие MLH1 или MSH2 коррелирует с отсутствием PMS2 или MSH6, соответственно
- Картина ИГХ окрашивания белков MMR помогает выбрать адекватный подход к генетическому тестированию

	IHC MLH1	IHC PMS2	IHC MSH2	IHC MSH6
MLH1 Mutation	Loss	Loss	Preserved	Preserved
MSH2 Mutation	Preserved	Preserved	Loss	Loss
MSH6 Mutation	Preserved	Preserved	Preserved	Loss
PMS2 Mutation	Preserved	Loss	Preserved	Preserved

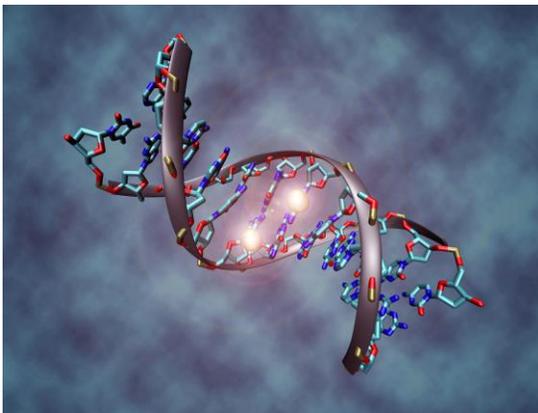
Sepulveda A. Medscape.org, 2008;571610.

MSI Disease State	MMR Mutations	IHC result MLH1	IHC result PMS2	IHC result MSH2	IHC result MSH6
Sporadic or Lynch syndrome	MLH1 Mutation	Loss	Loss	Preserved	Preserved
Lynch syndrome	MSH2 Mutation	Preserved	Preserved	Loss	Loss
Lynch syndrome	MSH6 Mutation	Preserved	Preserved	Preserved	Loss
Lynch syndrome	PMS2 Mutation	Preserved	Loss	Preserved	Preserved

Powered by OptiView IHC DAB detection system

Sepulveda A. Medscape.org, 2008;571610.

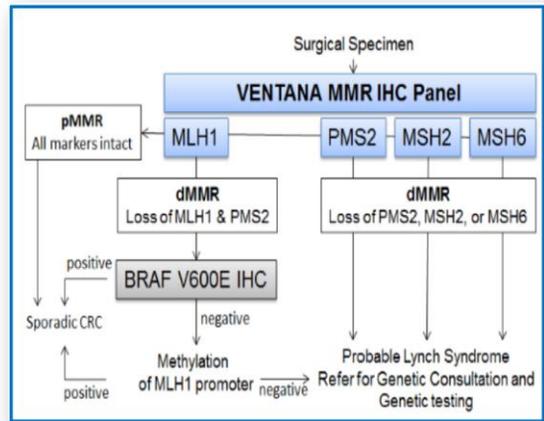
MSI есть, а синдрома Линча нет



- В спорадических КРК экспрессия гена MLH1 может быть подавлена метилированием его промотора
- Наличие мутации BRAF V600E с потерей белка MLH1 указывает на то, что опухоль является результатом спорадического возникновения и устраняет синдром Линча

Тест BRAF V600E

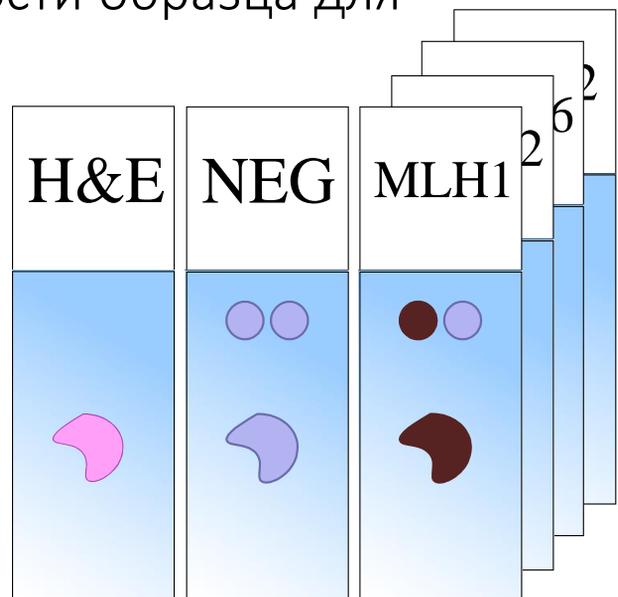
- Если не выявлены экспрессия BRAF V600E и MLH1, статус dMMR согласуется с синдромом Линча и требует генетического тестирования для подтверждения диагноза.



Завалишина Л. Э. Исследование микросателлитной нестабильности (MSI), 2020г.

Критерии приемлемости образца для исследования

- H&E \geq 50 жизнеспособных опухолевых клеток
- Препараты с отрицательным контрольным реагентом приемлемого качества
- Фоновое окрашивание приемлемое
- Контроль на уровне системы приемлем
- Внутренние положительные контроли имеют однозначное окрашивание ядер



Завалишина Л. Э. Исследование микросателлитной нестабильности (MSI), 2020г; из личного архива.

Алгоритм оценки образца для панели MMR ИНС

Интактный – Экспрессия белка	Нарушение экспрессии белка
<p>Однозначное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии приемлемых внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или нормальном эпителии вблизи опухоли)</p>	<p>Однозначная потеря ядерного окрашивания или очаговое слабое сомнительное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии внутренних положительных контролей</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Если во внутреннем положительном контроле отсутствует однозначное ядерное окрашивание и / или окрашивание фона мешает интерпретации, анализ следует считать неприемлемым и повторить. • Точечное ядерное окрашивание опухолевых клеток следует считать отрицательным (Нарушение экспрессии белка). • В случаях с очаговым окрашиванием опухолевых клеток интенсивность ядерного окрашивания должна быть, по крайней мере, интенсивностью внутреннего положительного контроля наряду с непрерывным окрашиванием ядер в нескольких эпителиальных железах => отсутствию нарушений (Интактный). • При отсутствии этого – Нарушение экспрессии белка. 	

Завалишина Л. Э. Исследование микросателлитной нестабильности (MSI), 2020г.

Не все потеряно!

The Journal of Pathology: Clinical Research
J Pathol Clin Res; April 2019; 5: 115–129
 Published online 19 December 2018 in Wiley Online Library
 (wileyonlinelibrary.com). doi: 10.1002/cjp2.120

ORIGINAL ARTICLE

Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation

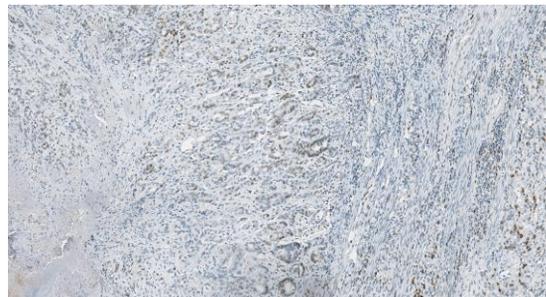
Aoife J McCarthy¹, Jose-Mario Capo-Chichi¹, Tara Spence², Sylvie Grenier², Tracy Stockley², Suzanne Kamel-Reid², Stefano Serra¹, Peter Sabatini² and Runjan Chetty^{1*}

¹Department of Anatomical Pathology, Laboratory Medicine Program, University Health Network and University of Toronto, Toronto, Canada
²Clinical Laboratory Genetics, University Health Network and University of Toronto, Toronto, Canada

*Correspondence to: R Chetty, Department of Anatomical Pathology, Laboratory Medicine Program, University Health Network, Toronto General Hospital, 200 Elizabeth Street, 11th Floor, Eaton Wing, Toronto General Hospital, Toronto, Ontario M5G 2C4, Canada.
 E-mail: runjan.chetty@gmail.com

Abstract

Immunohistochemistry (IHC) for mismatch repair (MMR) proteins is used to identify MMR status: being diffusely positive (intact/retained nuclear staining) or showing loss of nuclear tumour staining (MMR protein deficient).



- 4/233 (1,72%) КРК продемонстрировали гетерогенное окрашивание
- При генетическом исследовании опухоли показали гетерогенность – зоны без окрашивания продемонстрировали dMMR

McCarthy AJ, Capo-Chichi JM, Spence T, et al. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *J Pathol Clin Res*. 2019;5(2):115–129. doi:10.1002/cjp2.120; из личного архива.

Иммуногистохимический метод: за и против

За	Против
Простой, быстрый, автоматизированный тест	Ложная потеря окраски белков репарации без MSI (дефекты преаналитического этапа обработки тканей)
Выполним в любой лаборатории, выполняющей ИГХ исследования	Ложное сохранение окраски (синонимичные мутации в генах репарации ДНК)
Пригоден операционный и биопсийный материал (фиксированный формалином и залитый в парафин)	Необходима тщательная отработка теста и обучение интерпретации
Достаточно небольшого количества материала	
Идентификация поврежденного гена	

Завалишина Л. Э. Исследование микросателлитной нестабильности (MSI), 2020г.

Какие антитела можно использовать?

Производитель: Dako

Антитела:

1. Monoclonal Mouse Anti-Human MutS Protein Homolog 2 (MSH2), Clone FE11
2. Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6 (MSH6), Clone EP49
3. Monoclonal Rabbit Anti-Human Postmeiotic Segregation Increased 2 (PMS2), Clone EP51
4. Monoclonal Mouse Anti-Human MutL Protein Homolog 1 (MLH1), Clone ES05

Система детекции: EnVision Flex (Dako)

Производитель: Ventana

Антитела:

1. VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody
2. VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
3. VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody
4. VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Система детекции: OptiView DAB IHC Detection Kit с OptiView Amplification Kit

Завалишина Л. Э. Исследование микросателлитной нестабильности (MSI), 2020г.

Стоит обращать внимание



Contents lists available at ScienceDirect
Pathology - Research and Practice
journal homepage: www.elsevier.com/locate/prp

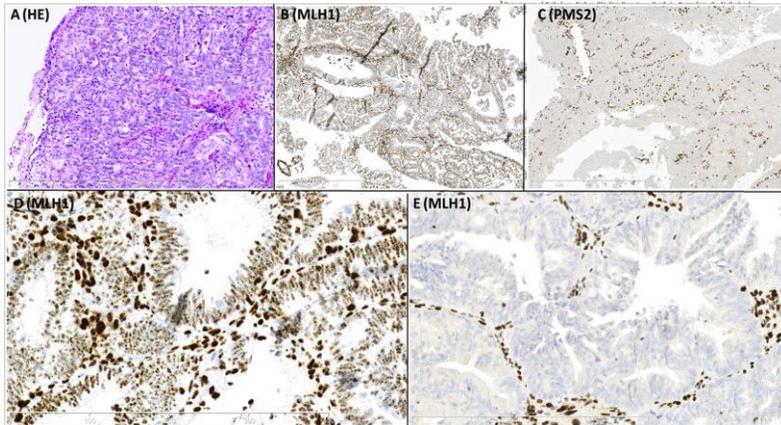


Case report

Granular dot-like staining with MLH1 immunohistochemistry is a clone-dependent artefact

S. Dasgupta^{a,*}, P.C. Ewing-Graham^a, F.H. Groenendijk^a, O. Stam^a, K.E. Biermann^a, M. Doukas^a, H.J. Dubbink^a, M.F. van Velthuisen^a, W.N.M. Dinjens^a, M.R. Van Bokstal^a

^aDepartment of Pathology, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, the Netherlands



* Mismatch repair proteins MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 is used for...
or its embryonic overexpression (COE) and endometrial overexpression (EC) level of

Клон M1

Клон ES05

Dasgupta S, Ewing-Graham PC, Groenendijk FH, et al. Granular dot-like staining with MLH1 immunohistochemistry is a clone-dependent artefact. *Pathol Res Pract.* 2020;216(1):152581. doi:10.1016/j.prp.2019.152581

Немного о вариабельности протоколов...

- Преаналитический этап состоит из 3 фаз, включающих различные реактивы, условия, продолжительность
- Этап постановки иммуногистохимической реакции имеет не менее 5 вариантов исполнения (вручную или в приборе, выбор антител, буфера, системы детекции, протокола)

Количество вариантов протоколов по данным NordiQC составляет

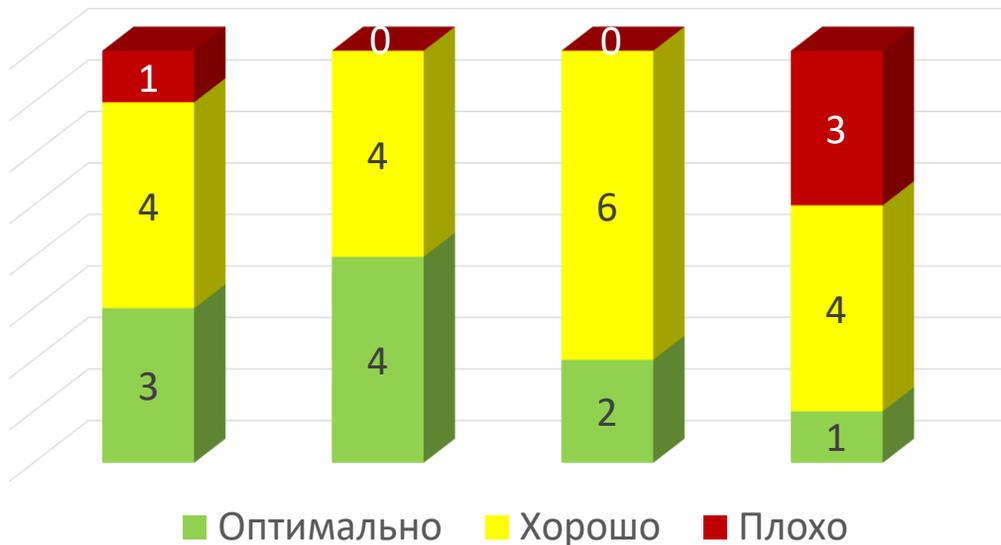
14 348 907

ЦЕНТР КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

- В раунде №210913 «Контроль применения и оценки маркёров MSI» приняли участие 8 крупных лабораторий
- Каждому участнику было разослано по 2 стекла с образцами опухолей и нормальной ткани
- Результаты оценивались на совете экспертов, где были выставлены коллегиально согласованные оценки

<https://ihccqc.rmapo.ru/>

Результаты раунда контроля качества



Из архива Центра контроля качества иммуногистохимических исследований

Основные проблемы



MHS2

- У всех снижена интенсивность окрашивания нормальных структур

MHS6

- У всех снижение интенсивности окрашивания

PMS2

- Сильное фоновое окрашивание
- Снижение интенсивности или не окрашивание нормальных структур
- Не валидирован протокол!

Из архива Центра контроля качества иммуногистохимических исследований

Спасибо за внимание!

aolga@list.ru

lhccqc@rmapo.ru