



ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России



Микросателлитная нестабильность.
Все ли так просто и как правильно изучать?

Цуканов Алексей Сергеевич



научно-практическая конференция
ОПУХОЛИ ЖКТ
3 декабря 2021 года

Когда-то давным давно...



Патанатомическое
отделение МГОБ 62

25 августа 2018 г. · 🌐



А.С. Цуканов, микросателлитная нестабильность и...

Лекция нашего дорогого гостя Алексея Сергеевича Цуканова, заведующего кабинетом лабораторной генетик...

Ещё

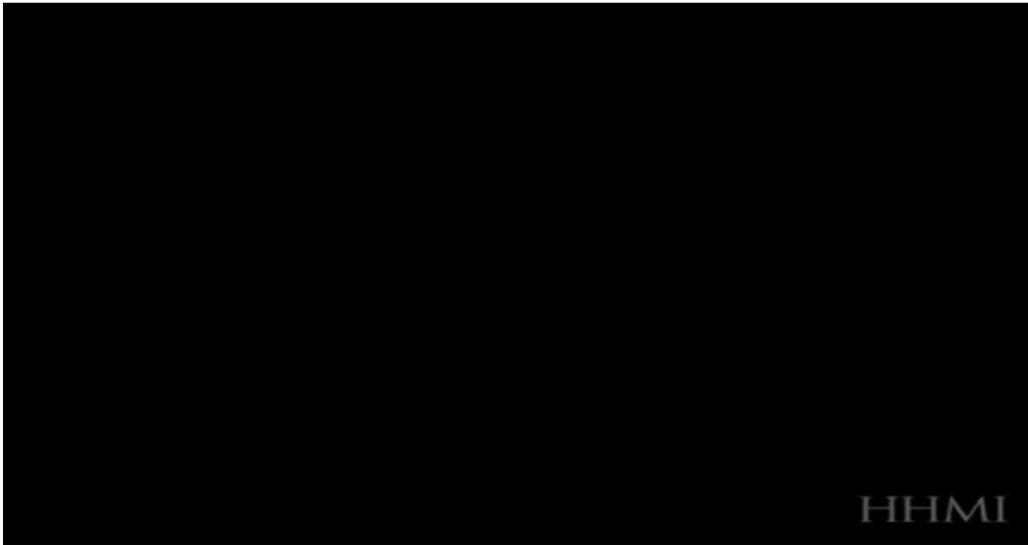


102

Комментарии: 2

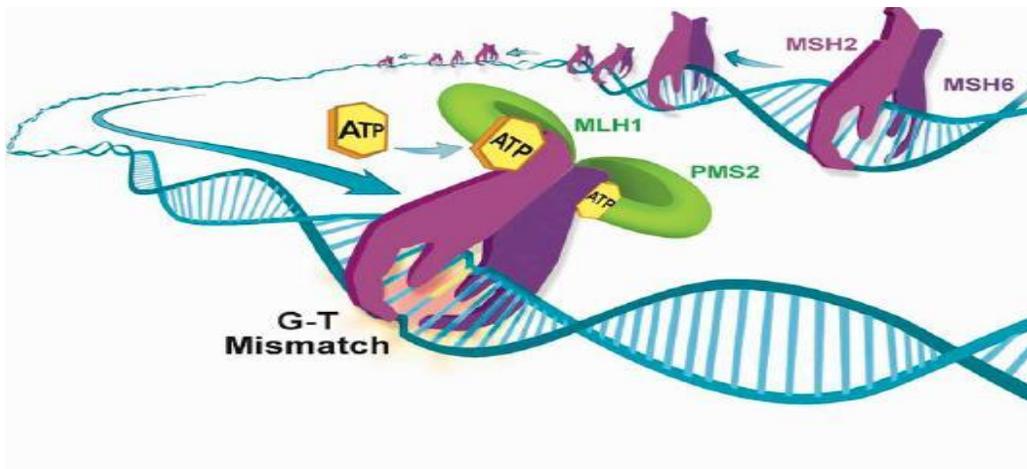
Просмотры: 7,8 тыс.

СИСТЕМА MISMATCH REPAIR



<http://www.youtube.com/watch?v=HYS6EKnQcv0>

СИСТЕМА MISMATCH REPAIR



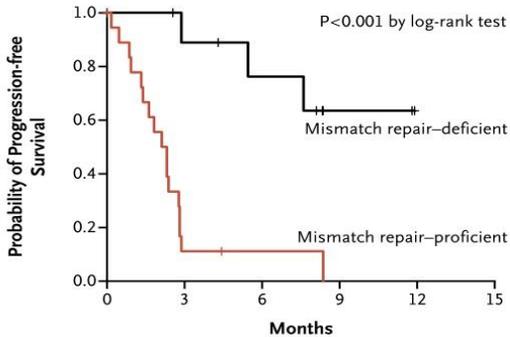
Gruber S. B. *Gastroenterology*, 2006

ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ СИНДРОМЕ ЛИНЧА

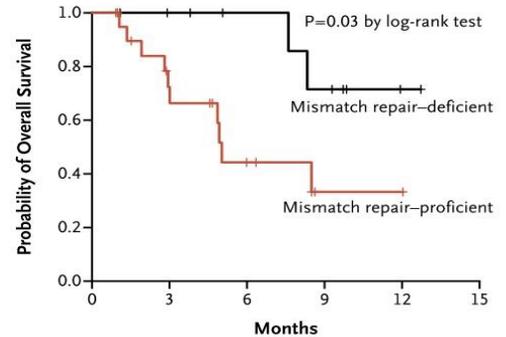


Препарат Pembrolizumab эффективен при синдроме Линча

A Progression-free Survival in Cohorts with Colorectal Cancer



B Overall Survival in Cohorts with Colorectal Cancer



Le D., Uram J., Wang H. et al. *NEJM* 2015

СИНДРОМ ЛИНЧА

- Около 70% от всех наследственных форм
- Описан в 1965 году
- Частота 1 на 300 человек
- Аутомно-доминантный тип наследования
- Сложные критерии клинического отбора
- Риск развития рака толстой кишки – 80%
- Возраст манифестации на 25-30 лет меньше популяционного возраста развития рака

- Диагноз – только генетически!!!



Henry T. Lynch
(1928-2019)



ДНК-ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЛИНЧА

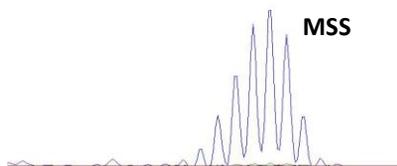
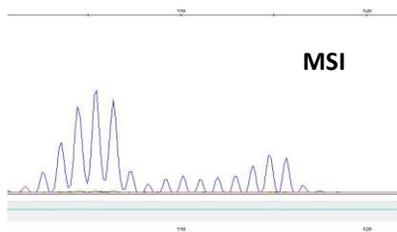
- *MLH1* – 19 кодирующих экзонов
- *MSH2* – 16 кодирующих экзонов
- *MSH6* – 10 кодирующих экзонов
- *PMS2* – 15 кодирующих экзонов
- *PMS1* – 12 кодирующих экзонов
- *EPCAM* – большие делеции



Генетические методы: секвенирование по Сэнгеру / *MLPA*
Срок исполнения – до 80 рабочих дней

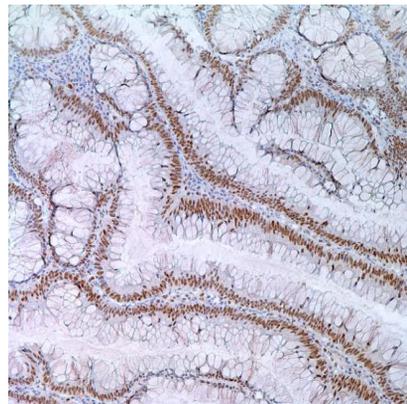
ДНК-ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЛИНЧА. Нулевой этап

5 микросателлитных маркеров



Чувствительность метода – 100%

4 моноклональных антитела: MLH1



Чувствительность метода – 94%

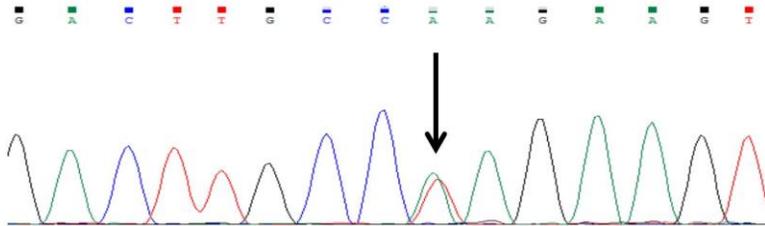
Vasen HF et al., 2007

ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЛИНЧА. Первый этап

MLH1 – 19 кодирующих экзонов

MSH2 – 16 кодирующих экзонов

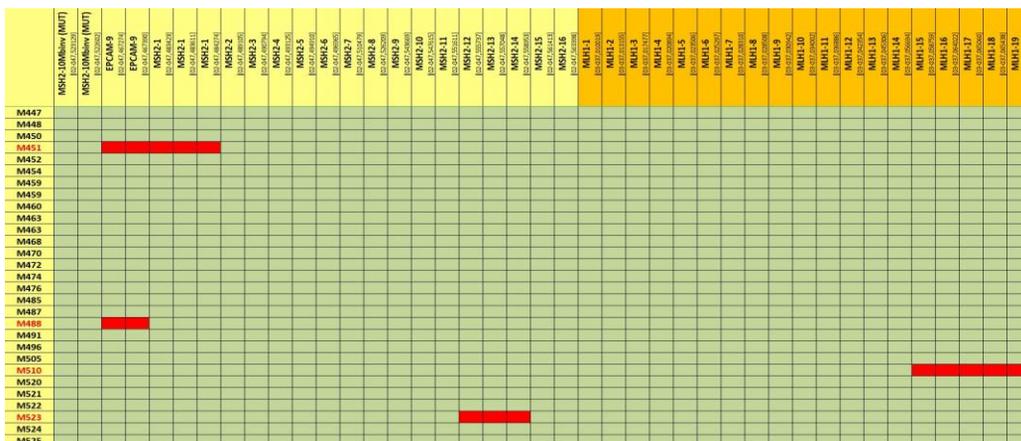
85% от всех мутаций при синдроме Линча



Генетические методы: секвенирование по Сэнгеру
Срок исполнения – до 21 рабочего дня

ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЛИНЧА. Второй этап

У 8% – большие перестройки генов *MLH1/MSH2/EPSCAM*



Генетический метод - MLPA
Срок исполнения - до 10 рабочих дней

ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЛИНЧА. Третий этап

- *MSH6* – 10 кодирующих экзонов
- *PMS2* – 15 кодирующих экзонов
- *PMS1* – 12 кодирующих экзонов
- *MLH3* – 12 кодирующих экзонов



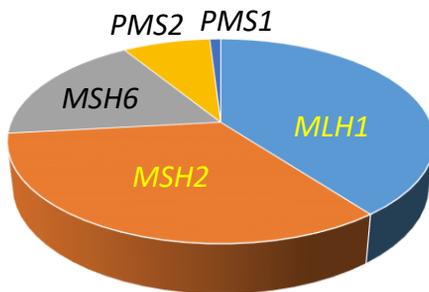
Преимущество высокопроизводительного секвенирования:

Секвенирование экзома (кодирующих последовательностей цепей ДНК на протяжении всего генома)

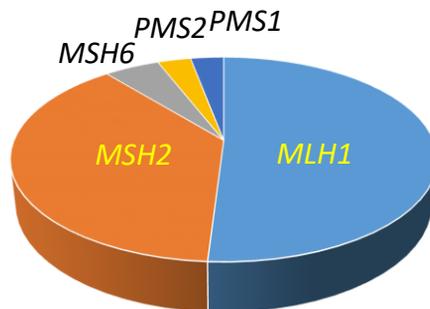
Возможно выявить как точечные мутации, так и средние и крупные делеции/инсерции

Избыточность данных, стоимость исследования и сложность анализа

СПЕКТР МУТАЦИЙ В ГЕНАХ MMR



ЕВРОПА И США



РОССИЯ

Peltomäki P., 2016
Цуканов А.С., 2017

КРИТЕРИИ ПЕРВИЧНОГО ОТБОРА ПАЦИЕНТОВ



Амстердамские критерии I + II

Возраст больного РТК до 50 лет
Три или более родственников с РТК
Заболевание в нескольких поколениях
САТК должен быть исключен
+ внекишечные раки



Рекомендации Бетезда (2004 г.):

Амстердамские критерии
+
микросателлитная
нестабильность

Vasen H.F. et al., 2007

КРИТЕРИИ НМИЦ КОЛОПРОКТОЛОГИИ ИМ. А.Н. РЫЖИХ



Колоректальный рак у пациента в возрасте до 43 лет

Чувствительность – 88,9%, Специфичность - 82,9%

Наряду с колоректальным раком еще 2 или более случаев рака любой локализации у пациента или его кровных родственников

Чувствительность – 100%, Специфичность - 64,7%



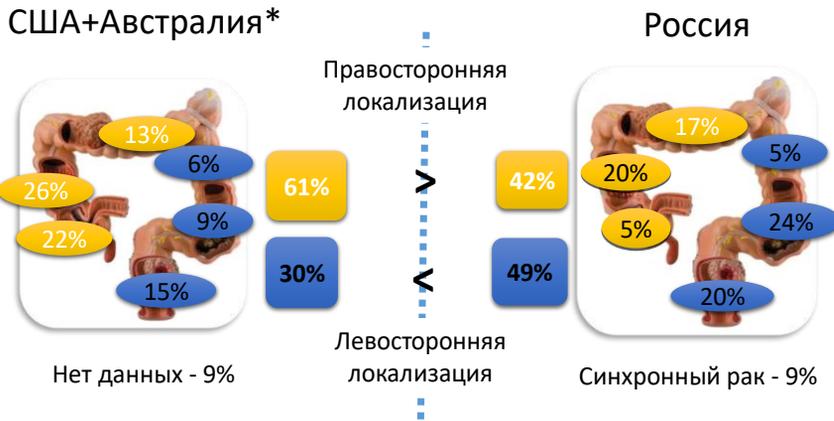
Цуканов А.С. и др., 2019

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЛЕКАРСТВЕННОМУ ЛЕЧЕНИЮ РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ И РЕКТОСИГМОИДНОГО СОЕДИНЕНИЯ

Коллектив авторов: Федянин М.Ю., Ачкасов С.И., Болотина Л.В., Гладков О.А., Глебовская В.В., Гордеев С.С., Карачун А.М., Козлов Н.А., Любченко Л.Н., Малихова О.А., Мамедли З.З., Медведева Б.М., Обухова О.А., Петров А.С., Подлужный Д.В., Проценко С.А., Рыжков А.Д., Рыков И.В., Сидоров Д.В., Трякин А.А., Цуканов А.С., Шельгин Ю.А.

DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-22

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЕРВИЧНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА



Shiovitz S. 2014*

Цуканов А.С. и др., 2017

ОБЪЕМ ОПЕРАТИВНОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА ПРИ ПЕРВОМ РАКЕ



Локализация в ободочной кишке – колэктомия

Локализация в прямой кишке - колпроктэктомия

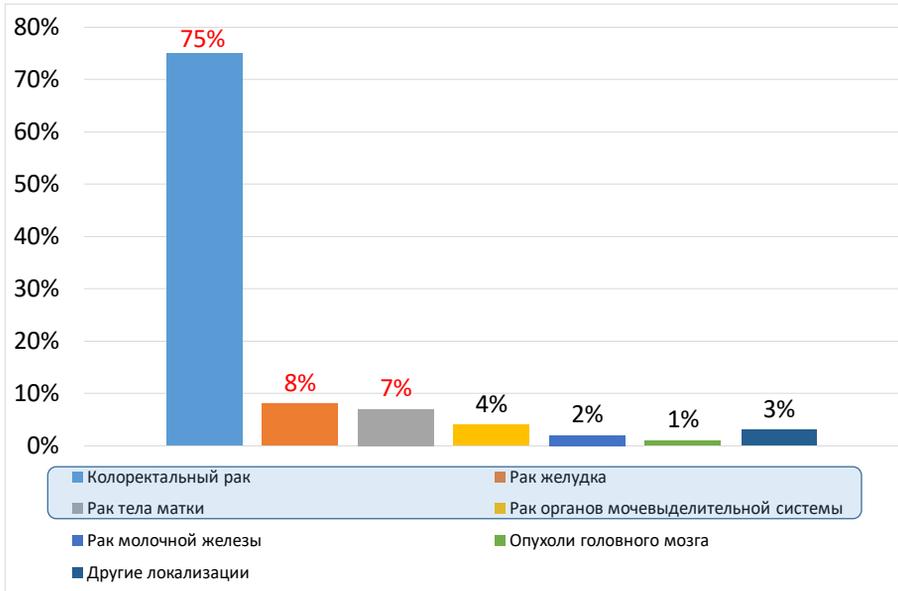


Развитие метакронного рака за 5 лет – 34%

Giardiello F. et al., 2021

Собственные данные

ЛОКАЛИЗАЦИЯ РАКА У РОССИЙСКИХ ПАЦИНТОВ



Цуканов А.С. и др., 2021

АЛГОРИТМ ЕЖЕГОДНОГО МОНИТОРИНГА НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИИ



Мутация в любом гене:

Колоноскопия с 22 лет

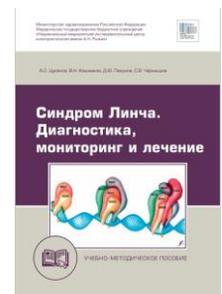
Гастроскопия с 27 лет

Женщинам - УЗИ матки с придатками с 27 лет

MSH2 - обследование органов мочевыделительной системы и выполнение цитологического анализа мочи с 32 лет

PMS1 - УЗИ щитовидной железы с 40 лет

MLH1 - МРТ головы с 22 лет, если в семье встретился хотя бы один случай опухоли головного мозга



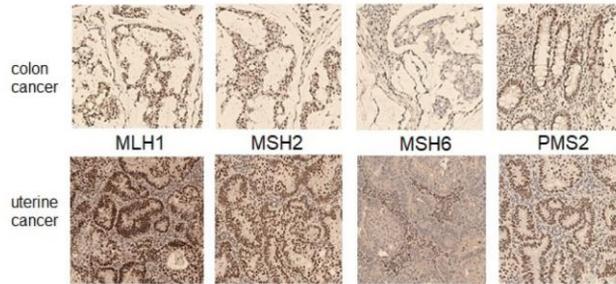
Цуканов А.С. и др., 2021



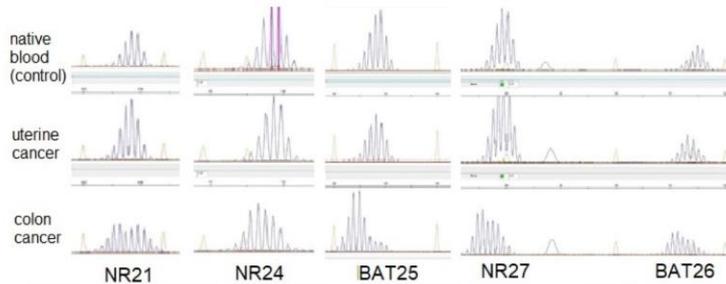
УНИКАЛЬНЫЙ ПАЦИЕНТ



A



B



УНИКАЛЬНЫЙ ПАЦИЕНТ



CASE REPORT article

Front. Oncol., 16 April 2021 | <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.652696>

Download Article



Export citation

Unique Combination of Diamond–Blackfan Anemia and Lynch Syndrome in Adult Female: A Case Report

Aleksey S. Tsukanov¹, Dmitry Y. Pikunov^{1*}, Vitaly P. Shubin¹, Aleksey A. Barinov¹, Vladimir N. Kashnikov¹, Yuri A. Shelygin¹, Andrey D. Kaprin², Elena V. Filonenko², Dmitry V. Sidorov², Aleksey A. Maschan³, Galina A. Novichkova³, Liudmila A. Yasko³, Elena V. Raykina³ and Aleksandr G. Rumyantsev³

¹Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology, Moscow, Russia

²National Medical Radiology Research Center, Moscow, Russia

³Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

We present an extremely rare clinical case of a 38-year-old Russian patient with multiple malignant neoplasms of the uterus and colon caused by genetically confirmed two hereditary diseases: Diamond–Blackfan anemia and Lynch syndrome. Molecular genetic research carried out by various methods (NGS, Sanger sequencing, aCGH, and MLPA) revealed a pathogenic nonsense variant in the *MSH6* gene: NM_000179.2: c.742C>T, p.(Arg248Ter), as well as a new deletion of the chromosome 15's locus with the capture of 82,662,932–84,816,747 bp interval, including the complete sequence of the *RPS17* gene. The lack of expediency of studying microsatellite instability in endometrial tumors using standard mononucleotide markers NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26 was demonstrated. The estimated prevalence of patients with combination of Diamond–Blackfan anemia and Lynch syndrome in the world is one per 480 million people.

1,627

TOTAL VIEWS

Ad score 1

View Article Impact



Suggest a Research Topic >

SHARE ON

European guidelines from the EHTG and ESCP for Lynch syndrome: an updated third edition of the Mallorca guidelines based on gene and gender

T. T. Seppälä^{1,2*}, A. Latchford^{3,4}, I. Negoi¹¹, A. Sampaio Soares¹², R. Jimenez-Rodriguez¹³, I. Sánchez-Guillén¹⁴, D. G. Evans⁵, N. Ryan^{6,7}, E. J. Crosbie⁸, M. Dominguez-Valentin¹⁵, J. Burn⁸, M. Kloor^{16,17}, M. von Knebel Doeberitz^{18,17}, F. J. B. van Duijnhoven¹⁹, P. Quirke⁹, J. R. Sampson²⁰, P. Møller^{15,19}, G. Möselein^{18,19}, on behalf of the European Hereditary Tumour Group (EHTG) and European Society of Coloproctology (ESCP)

BJS, 2021, Vol. 108, No. 5

Identification of Lynch syndrome
 MMR IHC or MSI testing for all CRC
 (followed by possible *MLH1* hypermethylation testing)

Conclusions and recommendations

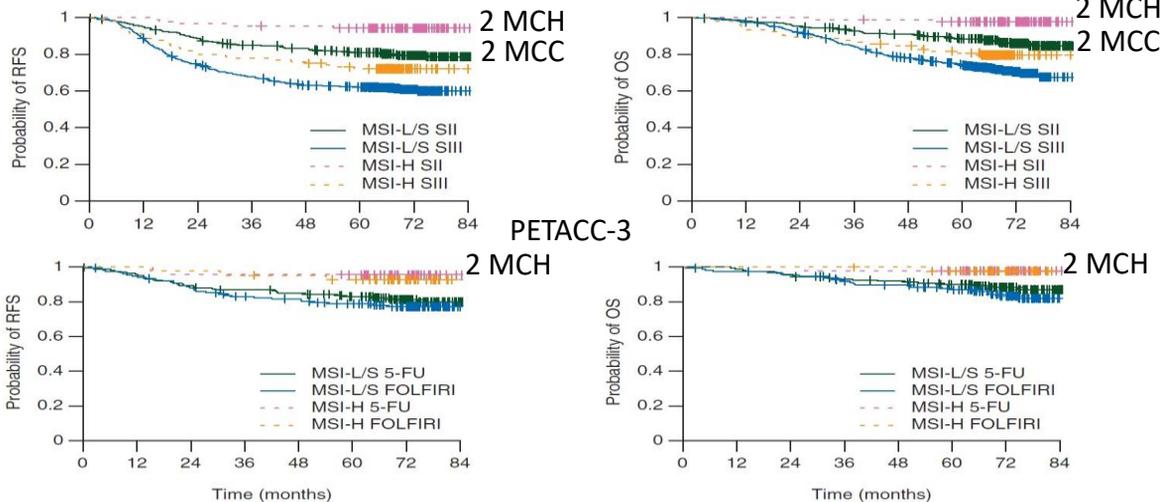
All colorectal cancers should be tested by MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) immunohistochemistry or MSI testing to screen for LS.

Patients with endometrial or ovarian cancer should be screened by **immunohistochemistry**

МСН И СПОРАДИЧЕСКИЕ ОПУХОЛИ

- 12% спорадических КРР
- При 2 стадии - 22%, при 3 - 12%, при 4 - 4%
- У половины больных старше 90 лет
- Решение вопроса о назначении адъювантной терапии у пациентов со 2 стадией КРР
- Иммуноterapia (Pembrolizumab, нивулумаб)
- *Прогноз заболевания благоприятный*
- *Зависимость прогноза от мутации в гене BRAF???!*

АДЬЮВАНТНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ ПРИ ОПУХОЛЯХ С МСН



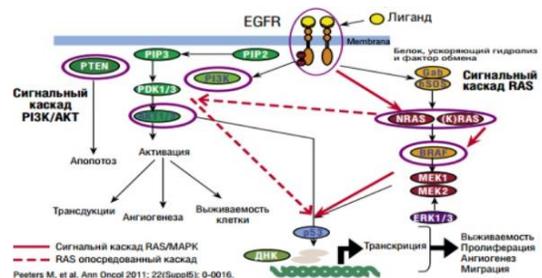
Пациентам со второй стадией опухоли с МСН не рекомендована адьювантная ХТ

Klingbiel D. et al. *Annals of Oncology*, 2015

B-type Raf kinase (*BRAF*)



- Частота мутации V600E при КРП – 8-14%
- Прогноз плохой
- Встречается у пациентов в возрасте после 70 лет
- Мутация V600E в 40-50% спорадических МСН-опухолей

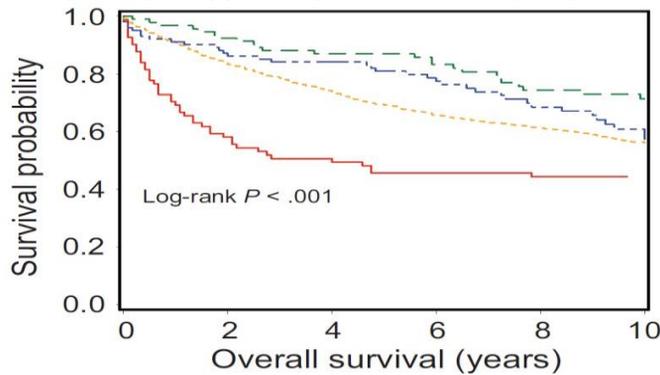


Wellbrock C. et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004

МСН И ГЕН *BRAF*



- 1253 пациента из США
- 182 пациента с мутацией в гене *BRAF* (14,5%)
- 193 пациента с МСН-опухолями (15,4%)
- МСН+*BRAF*-mut – 101 // МСН+*BRAF*-wt – 92

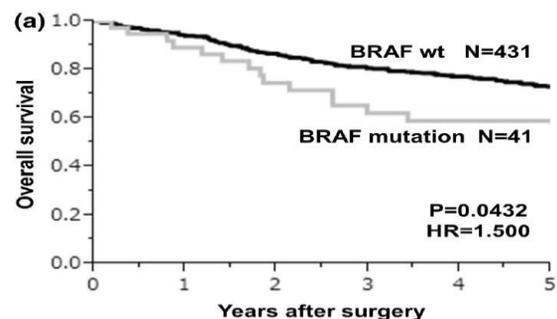
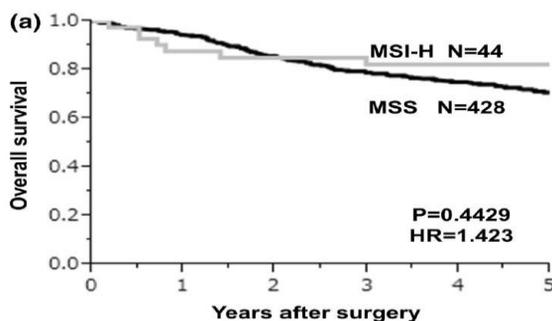


Lochhead P. et al. *J Natl Cancer Inst*, 2013

МСН И ГЕН *BRAF*

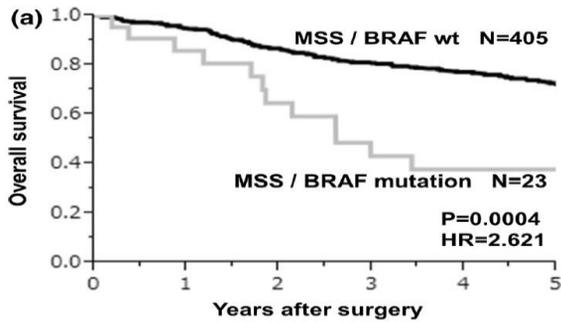


- 472 пациента из Японии
- 41 пациент с мутацией в гене *BRAF* (8,7%)
- 44 пациента с МСН-опухолями (9,3%)
- МСН+*BRAF*-mut – 18 // МСН+*BRAF*-wt – 26



Nakaji Y. et al. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016

МСН И ГЕН BRAF

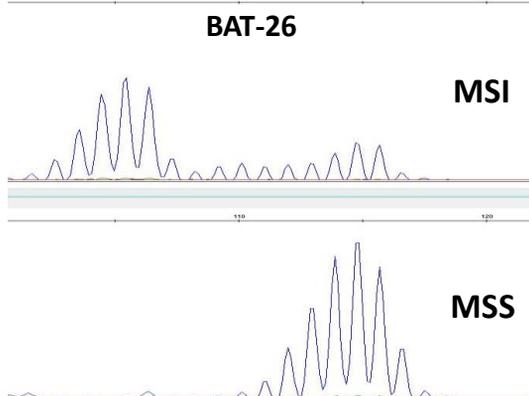


Nakaji Y. et al. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016

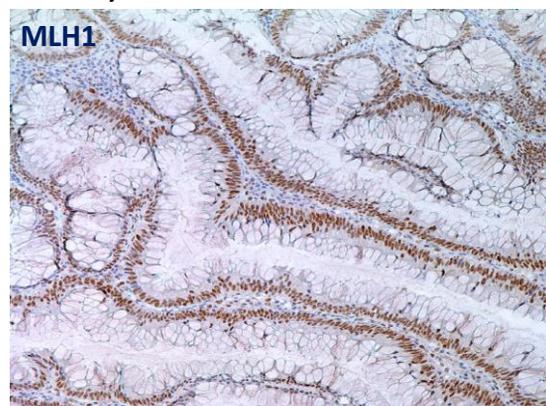
МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ. КАК ПРАВИЛЬНО ИЗУЧАТЬ?



Генетический



Иммуногистохимический



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПАНЕЛИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МСН



Table 1 International guidelines for evaluation of MSI in colorectal cancer

Reference panel			
Marker	Repeating unit	GenBank accession no.	
<i>BAT25</i>	Mononucleotide	9834508	
<i>BAT26</i>	Mononucleotide	9834505	
<i>D5S346</i>	Dinucleotide	181171	
<i>D2S123</i>	Dinucleotide	187953	
<i>D17S250</i>	Dinucleotide	177030	

Criteria for interpretation			
	5 loci analyzed	>5 loci analyzed	Interpretation
No. of markers	≥2	≥30–40%	MSI-H
Exhibiting instability	1	<30–40%	MSI-L
Length changes	0	0	MSS or MSI-L

Dietmaier W. et al. Cancer Res, 1997

MSI-L не существует

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. *Ann Oncol* [Internet]. 2019

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПАНЕЛИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МСН



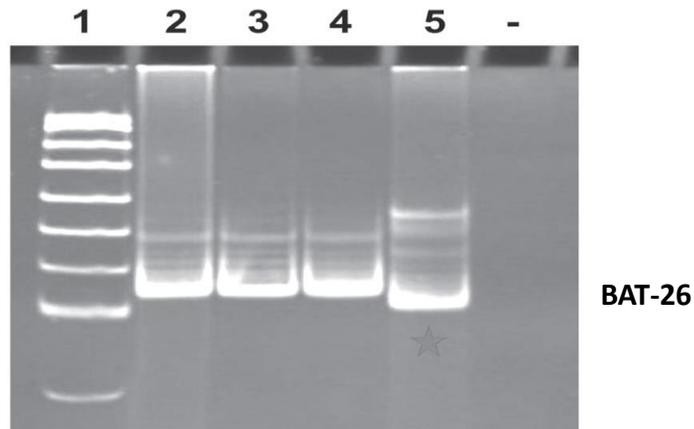
Панель, включающая все 5 мононуклеотидных маркеров

Name	Gene	Genbank number	Length and location of the repeat
BAT-26	hMSH2	U41210	26 (A) intron 5
BAT-25	c-kit	L04143	25 (T) intron 16
NR-21	SLC7A8	XM_033393	21 (T) 5' UTR
NR-22	Transmembrane precursor protein B5	L38961	22 (T) 3' UTR
NR-24	Zinc finger 2 (ZNF-2)	X60152	24 (T) 3' UTR

Suraweera N. et al. Gastroenterology, 2002

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МСН

Электрофорез

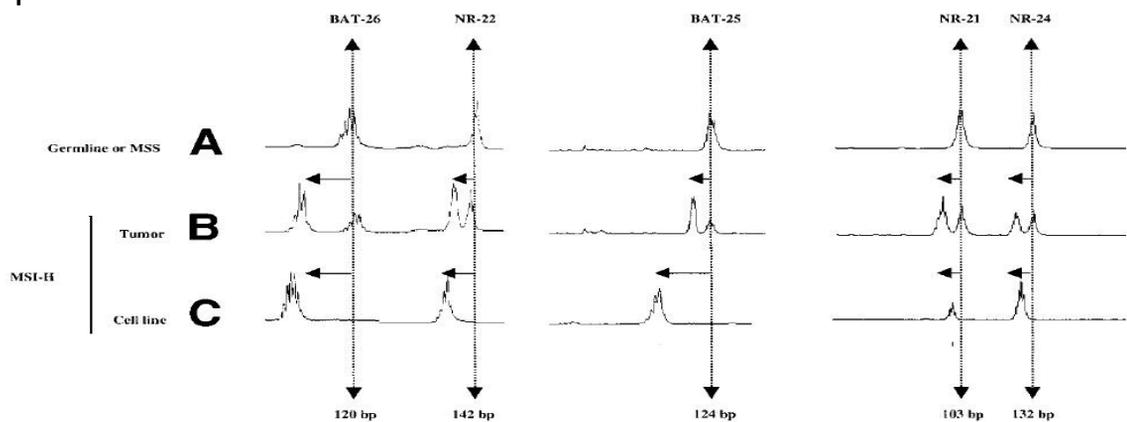


Г. Янус и др. СИБ. ОНК. ЖУРНАЛ, 2012

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МСН



Фрагментный анализ



Suraweera N. et al. Gastroenterology, 2002

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕТОДОВ ИГХ И МСН



Случаи КРР	Исследованы гены MMR	Мутации найдены	ИГХ	MSI-H
68	MLH1, MSH2	6	5/6	5/6
257	MLH1, MSH2	5	5/5	5/5
37	MLH1, MSH2	4	4/4	3/4
1119	MLH1, MSH2	230	216/230	230/230
1066	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	23	21/23	21/23
1222	MLH1, MSH2	11	11/11	10/11
131	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	18	18/18	17/18
870	MLH1, MSH2, MSH6	38	25/27	28/30
281	MLH1, MSH2, MSH6	25	23/25	25/25
		360	328/349 (94%)	344/352 (98%)

Vasen H. et al. J Med Genet 2007

Так работать нельзя!!!

ТОМ 6 / VOL. 6

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

37

Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 и оценка статуса микросателлитной нестабильности у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами

3 · 2019

Введение. Лейомиосаркома является одной из самых распространенных злокачественных опухолей мягких тканей. Радикальное хирургическое лечение с последующей адъювантной терапией остается наиболее эффективным методом. Иммунотерапия – перспективный метод противоопухолевого лечения, основанного на использовании антител, блокирующих лиганд PD-L1 (programmed death ligand 1) или рецептор PD-1 (programmed death 1). Уровень экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и наличие микросателлитной нестабильности (MSI) могут рассматриваться как прогностический и предиктивный маркер течения заболевания и эффективности иммунотерапевтического лечения.

Цель исследования – определить уровень экспрессии PD-L1 и статус MSI у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами и оценить их влияние на общую и безрецидивную выживаемость.

Материалы и методы. В исследование были включены 57 пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами, которым выполнялось хирургическое или комбинированное лечение. Проведен анализ клинических и морфологических показателей, изучены результаты хирургического лечения. Оценка экспрессии PD-L1 и MSI проводилась с использованием иммуногистохимического и молекулярно-генетического анализа.

Результаты. У 41 из 57 проанализированных пациентов была проведена оценка экспрессии PD-L1. В 10 (24 %) из 41 случая выявлена положительная экспрессия (уровень экспрессии составил 3–50 %). У 1 (2,4 %) пациента первичная опухоль и метастатический очаг имели низкий уровень MSI (MSI-low, MSI-L). Медиана наблюдения за больными составила 31 мес. У пациентов с положительной экспрессией PD-L1 по сравнению с больными с PD-L1-отрицательными опухолями выявлен более высокий индекс пролиферативной активности Ki-67 (58,8 и 47,8 % соответственно; $p = 0,02$), а также достоверно низкая медиана общей выживаемости при опухолях II степени злокачественности (30 и 105 мес; $p = 0,043$). При лейомиосаркомах III степени злокачественности отмечен тренд к снижению медианы общей выживаемости у больных с PD-L1-отрицательными опухолями (31,0 мес) по сравнению с пациентами с наличием экспрессии PD-L1 (61,2 мес) ($p = 0,11$).

Заключение. Частота экспрессии PD-L1 среди больных забрюшинными лейомиосаркомами в нашем наблюдении составила 24 % (10/41), статус MSI-L определен в 2,4 % (1/41) случаев. У больных с опухолью II степени злокачественности наличие экспрессии PD-L1 связано с достоверным снижением общей выживаемости. PD-L1 у больных забрюшинными лейомиосаркомами следует рассматривать как прогностический маркер и потенциальную терапевтическую мишень.

Ключевые слова: лейомиосаркома, экспрессия PD-L1, микросателлитная нестабильность

ЗАКЛЮЧЕНИЕ



Исследование МСН необходимо проводить у всех больных со 2 и 4 стадией КРР, а также пациентов молодого возраста и имеющих отягощенный семейный анамнез

При изучении опухолей толстой кишки целесообразно применять как молекулярно-генетическое, так и ИГХ-исследование

Изучение внекишечных опухолей на МСН – только ИГХ-исследование
НИКАКОГО MSI-LOW НЕТ!!!

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

