

DOI: <https://doi.org/10.17650/2618-7019-2024-7-3-17-25>

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ НЕСПАРЕННЫХ ОСНОВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

Кудайбергенова А. Г.¹, Сендерович А. И.^{2,3}, Горбань Н. А.²

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации; Россия, 121359 Москва, ул. Маршала Тимошенко, 15;

³Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51/1

Контакты: Горбань Нина Андреевна perovanina@mail.ru

Система репарации неспаренных оснований является одним из механизмов, лежащих в основе поддержания целостности генома. Она участвует в митотической и мейотической рекомбинации, апоптозе, перестройке генов иммуноглобулинов, соматической гипермутации и других процессах. Дефицит системы репарации неспаренных оснований (d-MMR) встречается в большинстве видов опухолей, он приводит к возникновению гипермутабельности и микросателлитной нестабильности. Определение дефицита системы репарации неспаренных оснований или микросателлитной нестабильности используется в диагностических, предиктивных и прогностических целях, в частности для скрининга синдрома Линча и выделения пациентов, которые отреагируют на терапию ингибиторами контрольных точек, а также для прогностической оценки клинического течения. В этой статье мы приводим краткий обзор практических методов определения дефицита системы репарации неспаренных оснований, уделяя особое внимание клиническому тестированию с помощью иммуногистохимической реакции, интерпретации результатов.

Ключевые слова: дефицит системы репарации неспаренных оснований (d-MMR), иммуногистохимическая реакция, синдром Линча, колоректальная карцинома

Для цитирования: Кудайбергенова А. Г., Сендерович А. И., Горбань Н. А. Анализ экспрессии белков системы репарации неспаренных оснований с помощью иммуногистохимической реакции. Онкопатология 2024;7(3):17–25. DOI: <https://doi.org/10.17650/2618-7019-2024-7-3-17-25>

Analysis of the expression of proteins of the unpaired base repair system using immunohistochemical reaction

Kudaibergenova A. G.¹, Senderovich A. I.^{2,3}, Gorban N. A.²

¹N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradsky St., vil. Pesochny, Saint Petersburg 197758, Russia;

²Central Clinical Hospital with a polyclinic, Administration of the President of the Russian Federation; 15 Marshala Timoshenko St., Moscow 121359, Russia;

³Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology named after N. A. Lopatkina – a branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 51/1 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia

Contacts: Gorban Nina Andreevna perovanina@mail.ru

Mismatch repair system is one of the mechanisms underlying maintenance of the genome integrity. It is involved in mitotic and meiotic recombination, apoptosis, immune globulin gene rearrangement, somatic hypermutation and other processes. Deficiency of mismatch repair system (d-MMR) occurs in most types of tumors, it leads to hypermutability and microsatellite instability. Recognition of mismatch repair system deficiency or microsatellite instability is used for

diagnostic, predictive, and prognostic purposes, in particular to screen for Lynch syndrome and identify patients who will respond to checkpoint inhibitor therapy, as well as for prognostic evaluation of clinical course. In the present article, we provide a brief overview of practical methods to recognize deficiency of mismatch repair system, focusing on clinical testing using immunohistochemical reaction and results' interpretation.

Keywords: deficiency of the mismatch repair system (d-MMR), immunohistochemical reaction, Lynch syndrome, colorectal carcinoma

For citation: Kudaibergenova A. G., Senderovich A. I., Gorban N. A. Analysis of the expression of proteins of the unpaired base repair system using immunohistochemical reaction. *Onkopatologiya = Oncopathology* 2024;7(3):17–25. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2618-7019-2024-7-3-17-25>

ВВЕДЕНИЕ

Иммуногистохимический (ИГХ) анализ экспрессии белков (MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2) системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair system, MMR) значительно проще и дешевле по сравнению с молекулярно-генетическими методами. ИГХ-исследование помогает довольно точно предположить измененный ген и является доступным в современной патологоанатомической практике. ИГХ-исследование MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2 при колоректальном раке (КРР) обычно проводят у пациентов в возрасте до 55 лет или с наличием этих опухолей в семейном анамнезе, а также до начала курса химиотерапии для стратификации групп прогноза.

Около 15 % КРР демонстрируют функциональный дефицит белков системы MMR, при этом только 2–4 % из них обусловлены синдромом Линча. Большинство опухолей с дефицитом белков системы репарации неспаренных оснований (т.е. с наличием микросателлитной нестабильности (microsatellite instability, MSI)) являются спорадическими, при этом пациенты по крайней мере со II стадией заболевания имеют более благоприятный прогноз течения заболевания, чем пациенты той же стадии, но без дефицита MMR, таким образом, речь идет о выделении группы пациентов с прогностически более благоприятным течением [1–4]. С другой стороны, в отличие от MSI-стабильных опухолей эти пациенты не получают значимой пользы от назначения 5-фторурацила при адьювантной терапии [5–7], но очень чувствительны к терапии ингибиторами контрольных точек [8].

В последнее десятилетие исследование опухолей на дефицит белков системы MMR, проводимое с помощью ИГХ-исследования, и микросателлитной нестабильности (MSI), выполняемое молекулярно-генетическими методами (полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование), заметно повысили чувствительность (>90 %) и специфичность скрининга синдрома Линча [9–12]. Скрининг КРР на синдром Линча был рекомендован многими организациями, включая EGAPP (рабочая группа, спонсируемая центрами по контролю и профилактике заболеваний) [13], NCCN (национальная комплексная онкологическая сеть) [14], ACG (Американская коллегия гастроэнтерологии) и ASCO (Американское общество клиниче-

ской онкологии) [15], ESMO (Европейское общество медицинской онкологии) [16].

MMR с помощью ИГХ-исследования и/или MSI с помощью ПЦР в настоящее время широко используют в качестве надежных и экономичных инструментов скрининга микросателлитной нестабильности и диагностики синдрома Линча [17, 18]. Поскольку в настоящее время скрининг рекомендуется всем пациентам с КРР, а амстердамские критерии 1990 г. и критерии Бетесда 2004 г. считаются недействительными, с 2018 г. Коллегия американских патологов (CAP) больше не рекомендует включать в морфологическое заключение признаки, предполагающие MSI (опухолеинфильтрирующие лимфоциты, лимфоцитарная реакция, напоминающая болезнь Крона, муцинозный или перстневидноклеточный подтип, медулярный характер роста) [4, 13].

БЕЛКИ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК

Белки системы репарации ДНК (MMR) – это ядерные белки, которые корректируют несоответствия между основаниями коротких повторяющихся нуклеотидных последовательностей, возникающих во время синтеза ДНК. *In vivo* MLH1/PMS2 и MSH2/MSH6 образуют 2 функциональные пары. Белки MSH2 и MSH6 формируют гетеродимер, функция которого заключается в выявлении петли инсерции или делеции, появляющейся во время репликации ДНК. При обнаружении ошибки в последовательности нуклеотидов к данному соединению прикрепляется комплекс белков PMS2 и MLH1. Вновь образованное соединение «вызывает» эндонуклеазы и синхронно с ними исправляет поврежденные участки ДНК [19]. Если MLH1 или MSH2 потеряны, их партнеры становятся нестабильным и деградируют. Однако обратное утверждение неверно, поскольку отсутствие PMS2 или MSH6 не влияет на стабильность MLH1 и MSH2, так как они могут быть стабилизированы путем связывания с другими молекулами [20].

ИГХ-исследование белков MMR позволяет визуализировать наличие экспрессии 4 белков в ядре. В целом присутствие всех 4 белков указывает на стабильность микросателлитов, хотя существуют исключения (в некоторых случаях с миссенс-мутацией окрашивание может сохраняться), тогда как потеря окрашивания

указывает на дефицит белков системы MMR, предполагая дефектный ген. Обоснованность метода «двух окрашиваний» (исследование только PMS2 и MSH6) основана на гетеродимерных парах белков MMR: PMS2 и MSH6 должны быть потеряны независимо от того, есть ли мутация в гене, кодирующем их или их гетеродимерных партнеров (MLH1 и MSH2). Однако скрининг MMR рекомендуется проводить с использованием всех 4 белков, поскольку метод определения экспрессии двух (только из PMS2 и MSH6) может пропустить случаи с дефицитом MMR, вызванные другими нарушениями [21].

Для скрининга MSI все вновь диагностированные колоректальные карциномы тестируют ИГХ-методом на MMR. Предлагаемый универсальный алгоритм скрининга показан на рис. 1.

Если присутствуют все 4 белка, KPP считается стабильным (MSS), что характерно для подавляющего большинства (85 %) колоректальных карцином. Дальнейшее обследование не требуется, если нет клинического подозрения на синдром Линча, например, возраст пациента моложе 50 лет. Среди оставшихся примерно 15 % случаев, которые относятся к MSI, наиболее распространенным дефектным нарушением является потеря MLH1/PMS2 при интактной экспрессии MSH2/MSH6. Большинство случаев с дефицитом MLH1/PMS2 представляет собой спорадические опухоли, вторичные по отношению к гиперметилации соматического промотора *MLH1* (12 %) [22], реже встречается синдром Линча из-за наследственной мутации *MLH1* или конституционального гиперметилирования промотора *MLH1* (<1 %) [23, 24]. Таким образом, анализ метилирования промотора *MLH1* опухоли является эффективным тестом по времени и затратам

для выявления пациентов со спорадическими опухолями, которые не нуждаются в дополнительных исследованиях. Вторым по частоте встречаемости нарушением является потеря экспрессии MSH2/MSH6 с интактной экспрессией MLH1/PMS2 (около 1 %). Изолированная потеря PMS2 или MSH6 встречается еще реже и с высокой долей вероятности указывает на наличие синдрома Линча. Такие случаи нуждаются в генетической консультации. Следует отметить, что гиперметилирование промотора *MLH1* часто является проявлением фенотипа метилирования CpG островков (CIMP), который представляет собой гиперметилирование промоторов нескольких генов. KPP с CIMP часто содержат мутации *BRAF* V600E и метилирование *MLH1*. Фактически более 2/3 опухолей с дефицитом белков системы MMR имеют *BRAF*-мутацию, и эти опухоли, скорее всего, являются спорадическими, поскольку мутация в гене *BRAF* не связана с синдромом Линча [25]. Многие лаборатории для выявления опухолей с потерей MLH1/PMS2 используют мутационный анализ *BRAF*, а не тестирование метилирования промотора *MLH1*. Однако в случаях отсутствия мутации *BRAF* все же показано тестирование на метилирование *MLH1*, поскольку мутацию *BRAF* содержат только около двух третей случаев метилирования [26, 27]. Наличие мутации *BRAF* также является неблагоприятным прогностическим фактором и может повлиять на решение о назначении терапии [28, 29]. ИГХ-окрашивание *BRAF* трудно интерпретировать из-за вариабельности окрашивания, и поэтому оценка статуса *BRAF* с помощью ПЦР является предпочтительным тестом [30]. Если гиперметилирование промотора *MLH1* или мутация *BRAF* V600E не обнаружены, пациентам показаны консультация врача-генетика и генетическое исследование на наличие наследственных мутаций.

Если этиология MSI не установлена после тестирования *BRAF* и/или анализа метилирования и наличия наследственных мутаций, следует рассмотреть возможность секвенирования ДНК опухоли на наличие двойных соматических мутаций генов MMR. Если двойные соматические мутации генов MMR обнаруживаются в опухоли без наследственной мутации, это подтверждает двойную соматическую мутацию как причину MSI. Двойная соматическая мутация, или соматическая мутация с потерей гетерозиготности (LOH), является наиболее частой причиной так называемого Lynch-like синдрома. Lynch-like синдром — это «зонтичный», обобщающий термин, который использовали для описания подобных необъяснимых случаев. Идентификация же ненаследственной причины MSI очень важна с клинической точки зрения, поскольку таким пациентам и их семьям не требуется интенсивный пожизненный скрининг на рак [31]. К сожалению, гистологические данные не позволяют отличить опухоли с двойными соматическими мутациями

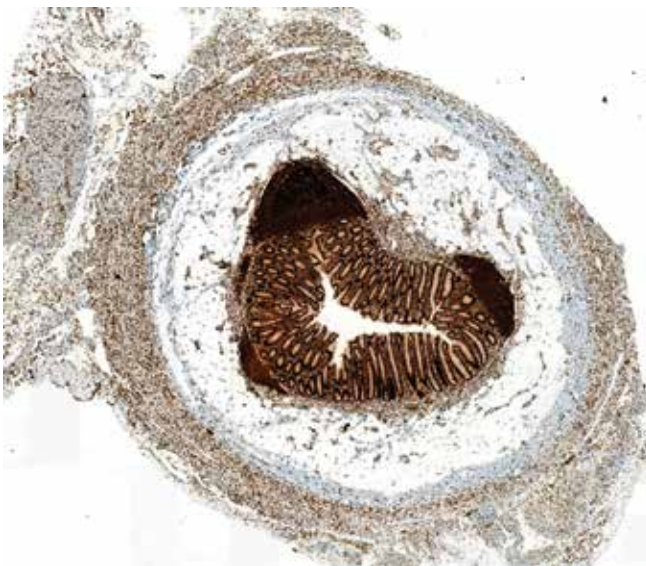


Рис. 1. Окрашивание всех клеток в аппендиксе (внешний контроль), $\times 5$
Fig. 1. Staining of all cells in the appendix (external control), $\times 5$

от опухолей, возникающих при синдроме Линча, и такие новообразования необходимо секвенировать [32]. Были идентифицированы и другие причины Lynch-like синдрома [33], в первую очередь, это неверная интерпретация результатов ИГХ-исследования (гипердиагностика синдрома Линча), наследственная патология, которая не обнаруживается с помощью имеющихся в настоящее время тестов, и другие генетические дефекты с фенотипом MSI, такие как мутации *MUTYH*, *POLE* и соматический мозаицизм.

Иммуногистохимический метод можно использовать как при наследственных, так и при спорадических или эпигенетических нарушениях, а потеря экспрессии того или иного белка (отсутствие окрашивания) может указывать на наиболее вероятный дефектный ген. Однако ИГХ-исследование MMR не является генетическим тестированием, поскольку позволяет оценить экспрессию белков, а не состояние генов.

Иммуногистохимическое исследование является надежным, быстрым и недорогим способом скрининга MSI. Однако могут быть серьезные проблемы с интерпретацией результатов, связанные с разными причинами. Осведомленность об этих подводных камнях поможет избежать ошибок в интерпретации.

ВЫБОР МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИГХ-ИССЛЕДОВАНИЯ

Успех ИГХ-исследования белков MMR напрямую зависит от адекватности материала. Исследования показали, что материал биопсии также хорошо пригоден для ИГХ-метода, как и материал резекции [34–36]. В небольших биоптатах чаще встречается краевой эффект окрашивания, в большом материале резекции из-за плохой фиксации снижается диффузия антител, и в центре опухоли окрашивание значительно слабее или вовсе может отсутствовать. Все же предпочтительнее исследовать материал предоперационной биопсии, поскольку результаты ИГХ-исследования могут изменить запланированную хирургическую тактику (сегментарная или субтотальная колэктомия), дать представление о состоянии MMR в опухоли до начала неоадьювантной терапии и избежать сложностей интерпретации ИГХ-окрашивания после лечения. Хорошо известно, что после лечения КРР обычно наблюдается снижение или вовсе отсутствие экспрессии белков MMR, особенно MSH6 и PMS2, что делает это исследование неинформативным [37–40].

В белках системы MMR существует высокая степень соответствия между первичной и метастатической колоректальной карциномой [41]. Однако для определения молекулярной эволюции опухоли предпочтителен материал метастатической опухоли или рецидива [42].

Если у пациента не одна опухоль, рекомендуется скрининг на дефицит белков системы MMR для всех синхронных/метахронных опухолей, поскольку

существует высокая частота дискордантности среди новообразований (31 %) [43]. Обнаружение одной MSS-стабильной опухоли не исключает вероятности нестабильности в другой. У пациентов с синдромом Линча может быть спорадическое новообразование, которое не связано с наследственным дефектом гена MMR.

Для скрининга MSI наиболее предпочтительный материал — фрагмент карциномы. Однако у пациента с подозрением на синдром Линча могут быть только аденомы. Поэтому клиницисты могут запросить ИГХ-тестирование аденомы. В таких ситуациях потеря экспрессии белков системы MMR помогает диагностировать синдром Линча, но интактная экспрессия белков системы MMR в аденомах не исключает его и встречается в 20–30 % случаев при синдроме Линча, поскольку аденома могла не получить вторую мутацию. Потеря окрашивания может быть идентифицирована в 70–79 % аденом, ассоциированных с синдромом Линча, особенно крупных аденом (>10 мм) с ворсинчатым компонентом или дисплазией высокой степени [44–47].

ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ

Критически важным фактором в интерпретации результатов ИГХ-исследования белков системы MMR, как и для любого другого ИГХ-исследования, является оценка внутреннего контроля. Белки системы MMR функционируют внутри ядра активно пролиферирующих клеток, поскольку они исправляют ошибки, сделанные во время синтеза ДНК. Следовательно, ожидается, что ядерное окрашивание белков MMR будет присутствовать в любых нормальных пролиферирующих клетках, например, в таких как лимфоциты, клетки крипт кишечника и некоторых стромальных клетках. Такие клетки служат внутренним положительным контролем при оценке ИГХ-исследования. Отсутствие экспрессии белков MMR в опухоли без окрашивания внутреннего контроля не подлежит интерпретации и требует повторного исследования на том же или другом блоке опухоли или проведения исследования другим методом (например, MSI ПЦР). Редким исключением из этого правила является наследственный дефицит белков системы MMR, при котором и опухоль, и любая нормальная ткань не экспрессируют белки MMR.

Пороговые значения. В большинстве работ для признания позитивного окрашивания используют пороговое значение 5 % ядер, демонстрирующих однозначное окрашивание (интенсивность окрашивания по крайней мере аналогична контролю). Однако хорошо изученного, точного порога нормы экспрессии белков MMR, основанного на доказательствах, до сих пор не установлено. Коллегия американских патологов рекомендует учитывать «любую положительную реакцию в ядрах опухолевых клеток» [48], а в других работах они предлагают в качестве порогового значения 1, 5 или 10 % [49].

Характер окрашивания. Типичное окрашивание интактной MMR при KPP – интенсивное ядерное в большинстве опухолевых клеток. Однако интенсивность окрашивания может варьировать от случая к случаю, а также от области к области в препарате. Такое колебание интенсивности окрашивания не является редкостью, а экспрессия белков MMR считается нормальной/интактной, если окрашивание ядер опухолевых клеток сопоставимо или сильнее, чем у клеток внутреннего контроля. Вариабельность окрашивания обычно связывают с диффузией антител, дефектами фиксации, тканевой гипоксией и краевым эффектом [50, 51].

Окрашивание опухоли слабее контроля. Иногда окрашивание ядер опухолевых клеток слабее, чем в клетках внутреннего контроля. В таких случаях необходимо провести повторное ИГХ-исследование. Если результат подтверждается, необходимо дать заключение о его неадекватности и отправить материал на дополнительные исследования (ПЦР). В некоторых таких случаях действительно выявляют дефицит MMR.

Цитоплазматическое окрашивание. Белки MMR располагаются в ядре клетки, соответственно, их экспрессия при ИГХ-исследовании является ядерной. Истинное исключительно цитоплазматическое окрашивание нужно рассматривать как патологическое, так как недавно описали цитоплазматическое окрашивание MSH2 у пациента с синдромом Линча со слиянием *EPCAM–MSH2* [52]. В перекрашенном препарате визуализируется выраженное как ядерное, так и цитоплазматическое окрашивание, и тогда практически невозможно понять, где ложно-позитивное окрашивание при опухолях MSI, а где при опухолях MSS ядерное окрашивание незаметно на фоне цитоплазматического. В таком случае необходимо тщательно отработать протокол окрашивания, соблюдая все требования, предъявляемые к оптимальной ИГХ-окраске, и провести повторное исследование, возможно, с изменением условий (снижение титра антител, уменьшение времени демаскировки или выбор другой системы визуализации), которое должно помочь прояснить ситуацию.

ГЕТЕРОГЕННОЕ ОКРАШИВАНИЕ MSH6

При KPP с дефицитом MLH1/PMS2 может встречаться гетерогенное окрашивание MSH6 из-за соматической мутации нестабильного мононуклеотидного тракта в *MSH6* [53, 54]. Наследственные мутации *MSH6* в таких случаях пока не обнаружены.

МИССЕНС-МУТАЦИЯ С СОХРАНЕНИЕМ АНТИГЕННОСТИ БЕЛКА

Наличие окрашивания белков системы MMR однозначно не исключает возможность наследственных мутаций/синдрома Линча. Так, около 3–10 % случаев синдрома Линча имеют дефектную экспрессию бел-

ков системы MMR в результате миссенс-мутаций, вызывающих структурные/функциональные нарушения. Белок сохраняет свой сайт связывания антител при ИГХ-реакции и, следовательно, демонстрирует «нормальное» ядерное окрашивание. Наиболее часто миссенс-мутации *MLH1* наблюдаются в случаях с изолированной потерей окрашивания PMS2 (окрашивание MLH1 сохраняется, несмотря на дисфункциональный белок MLH1) [55, 56].

ТЕРМИНОЛОГИЯ ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Коллегия американских патологов рекомендует использовать термины «интактная ядерная экспрессия» или «отсутствие ядерной экспрессии» вместо «положительный» или «отрицательный» при исследовании ИГХ-статуса белков системы репарации ДНК, чтобы избежать путаницы [48]. Например, «положительный результат» можно интерпретировать как «положительный результат на дефицит MMR» или «положительное окрашивание» (нормальный/неповрежденный характер окрашивания), причем значения этих интерпретаций диаметрально противоположные.

ВНЕШНИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ИГХ-ИССЛЕДОВАНИЙ MMR

По данным сайта Внешнего контроля северных стран (Immunohistochemical Quality Control, NordiQC; <https://www.nordiqc.org/about.php>), подавляющее большинство неудовлетворительных ИГХ-окрасок (90 % – для MLH1, 64 % – для MSH2, 89 % – для MSH6 и 71 % – для PMS2) связаны с ложно-отрицательной оценкой ИГХ-окрашивания и, как результат, гипердиагностикой дефицита белков системы MMR. Проводили ИГХ-окрашивание контрольных препаратов, которые включали срезы миндалина и аппендикса и 3 фрагмента опухоли: 2 – с генетически подтвержденной MSI и один – MSS. Показателями оптимально откалиброванного протокола ИГХ-исследования для всех белков MMR является наличие окрашивания в ядрах клеток с низким уровнем антигенной активности – это В-клетки в зоне мантии, гладкомышечные и стромальные клетки, а не только наличие экспрессии в клетках с высоким уровнем антигенной активности, к которым относятся пролиферирующие В-клетки в герминальных центрах лимфоидных фолликулов и ядрах эпителия аппендикса (рис 1, 2).

Соответственно, интактная ядерная экспрессия в окружающих опухоль стромальных клетках также является адекватным внутренним контролем при оценке экспрессии белков MMR (рис. 3–5) (NordiQC).

MLH1

Из 259 лабораторий, принявших участие в тестировании, 233 (90 %) смогли продемонстрировать оптимальные и хорошие результаты окрашивания. Несмотря на большое разнообразие представленных



Рис. 2. Окрашивание всех клеток в миндалине (внешний контроль), $\times 5$
Fig. 2. Staining of all cells in the amygdala (external control), $\times 5$

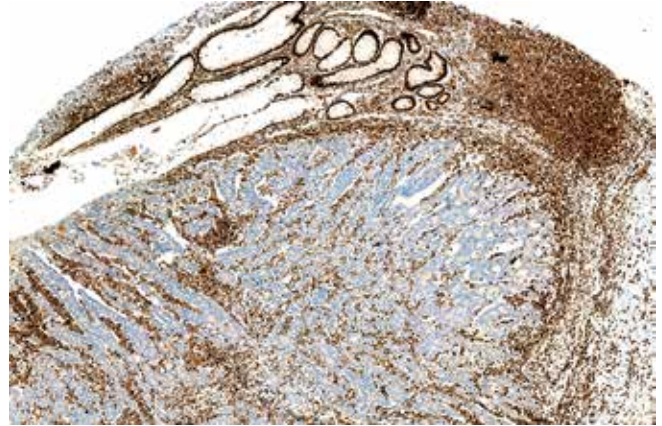


Рис. 5. MSH1. Отсутствие окрашивания в опухолевых клетках при адекватном позитивном внутреннем контроле (интактное окрашивание ядер клеток стромы и кишечного эпителия), $\times 20$

Fig. 5. MSH1. Lack of staining in tumor cells with adequate positive internal control (intact staining of the nuclei of stromal cells and intestinal epithelium), $\times 20$

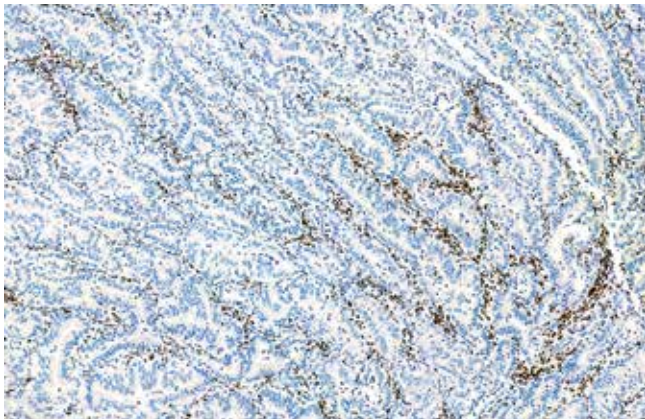


Рис. 3. MLH1. Отсутствие окрашивания в опухолевых клетках при адекватном, позитивном внутреннем контроле (интактное окрашивание ядер клеток стромы), $\times 20$

Fig. 3. MLH1. Lack of staining in tumor cells with adequate positive internal control (intact staining of stromal cell nuclei), $\times 20$

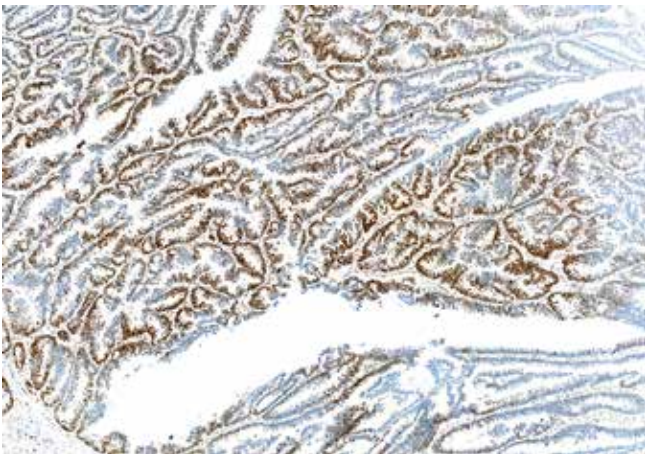


Рис. 4. MLH1. Интактная ядерная экспрессия в опухолевых клетках, $\times 20$
Fig. 4. MLH1. Intact nuclear expression in tumor cells, $\times 20$

на тестирование клонов (BC23, BS 29, ES05, G168–15, GM011, INC409 и M1), эксперты NordiQC среди ведущих причин неудовлетворительного ИГХ-окрашивания называют неудачные первичные антитела. Подавляющее большинство лабораторий пользуются всего двумя – ES05 и M1, причем клон M1 представлен только в формате RTU (готового к работе). В качестве других причин неудовлетворительных результатов ИГХ названы следующие: использование низкой концентрации первичных антител и малочувствительных систем визуализации. Основной проблемой (81 %) является ложно-негативное окрашивание (NordiQC).

MSH2

81 % лабораторий показали оптимальные и хорошие результаты окрашивания этим антителом. Здесь также представлено разнообразие клонов (FE11, G219–1129, 79H11, MX061). Среди ведущих причин неудовлетворительного ИГХ-окрашивания эксперты NordiQC называют неудачные протоколы высокотемпературной обработки и использование высокочувствительных или, наоборот, малочувствительных систем визуализации. Основной проблемой (64 %) является ложно-негативное окрашивание. Наличие выраженного перекрестного цитоплазматического окрашивания, которое препятствует адекватной оценке MSH2, явилось причиной неудовлетворительного результата в 36 % случаях (NordiQC).

MSH6

С точки зрения экспертов NordiQC это самое сложное антитело в плане достижения оптимальных или хотя бы удовлетворительных результатов ИГХ-окрашивания. Только 52 % лабораторий (126 из 242 лабораторий-участниц) смогли показать адекватное окрашивание с этим антителом. Следует подчеркнуть, что среди

представленных на тестирование клонов – BSR100, E49, EPR3945 и SP93 – 53 % лабораторий (127 из 242) используют клон E49. При этом эксперты NordiQC в качестве основных причин неудовлетворительного окрашивания называют использование неудачных клонов MSH6 (в частности, старого клона 44 вместо нового SP93) вместе с использованием малочувствительных систем визуализации и неудачных протоколов высокотемпературной обработки. Основной проблемой (89 %) при неудовлетворительном ИГХ-исследовании MSH6 является ложно-негативное окрашивание (NordiQC).

PMS2

Адекватное окрашивание с антителом PMS2 смогли показать 89 % лабораторий (218 из 246 лабораторий-участниц). Среди представленных на тестирование клонов – A16–4, M0R4G, MRQ-28, EP51, EPR3947 – 3 последних являются моноклональными кроличьими антителами. Эксперты NordiQC среди основных причин неудовлетворительного окрашивания называют использование малочувствительных систем визуализации,

неудачные протоколы высокотемпературной обработки, а также неправильно подобранные разведения для концентрированных антител. Основной проблемой (71 %) при неудовлетворительном окрашивании ИГХ-исследования PMS2 является ложно-негативное окрашивание. В оставшихся 39 % причинами неудовлетворительного окрашивания были выраженное фоновое окрашивание, препятствующее оценке окрашивания, и слабое специфическое (ядерное) окрашивание (NordiQC).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование dMMR/MSI-H имеет важное предиктивное значение для большинства солидных опухолей. Опухоли с MSI из-за особенностей клинического течения необходимо выделять в отдельную группу не только для скрининга синдрома Линча, но и для выбора более корректной схемы адъювантной терапии. Для определения dMMR/MSI-H методом выбора является ИГХ-исследование с отработанным протоколом, оценкой внутренних и внешних контролей на каждом стекле.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Popat S., Hubner R., Houlston R.S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23(3):609–18. DOI: 10.1200/JCO.2005.01.086
2. Tejpar S., Saridaki Z., Delorenzi M. et al. Microsatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer: more complexity to the puzzle. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(11):841–4. DOI: 10.1093/jnci/djr170
3. Hutchins G., Southward K., Handley K. et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1261–70. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.1366
4. Benatti P., Gafà R., Barana D. et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11(23):8332–40. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1030
5. Sargent D.J., Marsoni S., Monges G. et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(20):3219–26. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.1825
6. Ribic C.M., Sargent D.J., Moore M.J. et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349(3):247–57. DOI: 10.1056/NEJMoa022289
7. Carethers J.M., Smith E.J., Behling C.A. et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004;126(2):394–401. DOI: 10.1053/j.gastro.2003.12.023
8. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596
9. Hampel H., Frankel W.L., Martin E. et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352(18):1851–60. DOI: 10.1056/NEJMoa043146
10. Lindor N.M., Burgart L.J., Leontovich O. et al. Thibodeau, Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20(4):1043–8. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.4.1043
11. de Jong A.E., van Puijenbroek M., Hendriks Y. et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):972–80. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-0956-3
12. Southey M.C., Jenkins M.A., Mead L. et al. Use of molecular tumor characteristics to prioritize mismatch repair gene testing in early-onset colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(27):6524–32. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.671
13. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group, Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med* 2009;11:35–41.
14. Hampel H. NCCN increases the emphasis on genetic/familial high-risk assessment in colorectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2014;12(5 Suppl):829–31. DOI: 10.6004/jnccn.2014.0200
15. Syngal S., Brand R.E., Church J.M. et al. American College of Gastroenterology, ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 2015;110(2):223–62, quiz 263. DOI: 10.1038/ajg.2014.435
16. Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L. et al. 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* 2019;30(8):1232–43. DOI: 10.1093/annonc/mdz116
17. Lynch H.T., Snyder C.L., Shaw T.G. et al. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nat Rev Cancer* 2015;15(3):181–94. DOI: 10.1038/nrc3878
18. Hampel H., Frankel W.L., Martin E. et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(35):5783–8. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.5950
19. Gruber S.B. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 2006;130(2):577–87. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.01.031

20. Li G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008;18(1):85–98. DOI: 10.1038/cr.2007.115
21. Pearlman R., Markow M., Knight D. et al. Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency. *Mod Pathol* 2018;31(12):1891–900. DOI: 10.1038/s41379-018-0058-y
22. Boland C.R., Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6):2073–87.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.064
23. Rahner N., Friedrichs N., Steinke V. et al. Coexisting somatic promoter hypermethylation and pathogenic MLH1 germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol* 2008;14(1):10–6. DOI: 10.1002/path.2263
24. Niessen R.C., Hofstra R.M.W., Westers H. et al. Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48(8):737–44. DOI: 10.1002/gcc.20678
25. Weisenberger D.J., Siegmund K.D., Campan M. et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38(7):787–93. DOI: 10.1038/ng1834
26. Parsons M.T., Buchanan D.D., Thompson B. et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 2012;49(3):151–7. DOI: 10.1136/jmedgenet-2011-100714
27. Adar T., Rodgers L.H., Shannon K.M. et al. A tailored approach to BRAF and MLH1 methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome. *Mod Pathol* 2017;30(3):440–7. DOI: 10.1038/modpathol.2016.211
28. Yuan Z.-X., Wang X.-Y., Qin Q.-Y. et al. The prognostic role of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer receiving anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8(6):e65995. DOI: 10.1371/journal.pone.0065995
29. Roth A.D., Tejpar S., Delorenzi M. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010;28(3):466–74. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.3452
30. Bellizzi A.M. Screening for Lynch syndrome: a no-brainer: BRAF V600E mutation-specific immunohistochemistry: caveat emptor. *Am J Clin Pathol* 2015;143:320–4. DOI: 10.1309/AJCP3ZDD3LTHWCZK
31. Haraldsdottir S., Hampel H., Tomsic J. et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* 2014;147(6):1308–16.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.08.041
32. Hemminger J.A., Pearlman R., Haraldsdottir S. et al. Histology of colorectal adenocarcinoma with double somatic mismatch-repair mutations is indistinguishable from those caused by Lynch syndrome. *Hum Pathol* 2018;78:125–30. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.04.017
33. Chen W., Swanson B.J., Frankel W.L. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol* 2017;12(1):24. DOI: 10.1186/s13000-017-0613-8
34. Kumarasinghe A.P., de Boer B., Bateman A.C., Kumarasinghe M.P. DNA mismatch repair enzyme immunohistochemistry in colorectal cancer: a comparison of biopsy and resection material. *Pathology* 2010;42(5):414–20. DOI: 10.3109/00313025.2010.493862
35. Shia J., Stadler Z., Weiser M.R. et al. Immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins in intestinal tract carcinoma: how reliable are biopsy samples? *Am J Surg Pathol* 2011;35(3):447–54. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31820a091d
36. Vilkin A., Leibovici-Weissman Y., Halpern M. Immunohistochemistry staining for mismatch repair proteins: the endoscopic biopsy material provides useful and coherent results. *Hum Pathol* 2015;46(11):1705–11. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.07.009
37. Bao F., Panarelli N.C., Rennert H. et al. Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010;34(12):1798–804. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181f906cc
38. Radu O.M., Nikiforova M.N., Farkas L.M., Krasinskas A.M. Challenging cases encountered in colorectal cancer screening for Lynch syndrome reveal novel findings: nucleolar MSH6 staining and impact of prior chemoradiation therapy. *Hum Pathol* 2011;42(9):1247–58. DOI: 10.1016/j.humpath.2010.11.016
39. Vilkin A., Halpern M., Morgenstern S. How reliable is immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins performed after neoadjuvant chemoradiation? *Hum Pathol* 2014;45(10):2029–36. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.07.005
40. Kuan S.-F., Ren B., Brand R. et al. Neoadjuvant therapy in microsatellite-stable colorectal carcinoma induces concomitant loss of MSH6 and Ki-67 expression. *Hum Pathol* 2017;63:33–9. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.02.003
41. Haraldsdottir S., Roth R., Pearlman R. et al. Mismatch repair deficiency concordance between primary colorectal cancer and corresponding metastasis. *Fam Cancer* 2016;15(2):253–60. DOI: 10.1007/s10689-015-9856-2
42. Sepulveda A.R., Hamilton S.R., Allegra C.J. et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from the American Society for clinical pathology, College of american pathologists, Association for molecular pathology, and American Society of clinical oncology. *J Clin Oncol* 2017;35(13):1453–86. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.9807
43. Roth R.M., Haraldsdottir S., Hampel H. et al. Discordant mismatch repair protein immunoreactivity in Lynch syndrome-associated neoplasms: A recommendation for screening synchronous/metachronous neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2016;146(1):50–6. DOI: 10.1093/ajcp/aqw067
44. Bellizzi A.M., Frankel W.L. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 2009;16(6):405–17. DOI: 10.1097/PAP.0b013e3181bb6bdc
45. Kalady M.F., Kravochuck S.E., Heald B. et al. Defining the adenoma burden in lynch syndrome *Dis Colon Rectum* 2015;58(4):388–92. DOI: 10.1097/DCR.0000000000000333
46. Walsh M.D., Buchanan D.D., Pearson S.-A. et al. Immunohistochemical testing of conventional adenomas for loss of expression of mismatch repair proteins in Lynch syndrome mutation carriers: a case series from the Australasian site of the colon cancer family registry. *Mod Pathol* 2012;25(5):722–30. DOI: 10.1038/modpathol.2011.209
47. Yurgelun M.B., Goel A., Hornick J.L. et al. Microsatellite instability and DNA mismatch repair protein deficiency in Lynch syndrome colorectal polyps. *Cancer Prev Res* 2012;5(4):574–82. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0519
48. Bartley A.N., Hamilton S.R., Alsabeh R. et al. Members of the cancer biomarker reporting Workgroup, College of american pathologists, template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):166–70. DOI: 10.5858/arpa.2013-0231-CP
49. Pai R.K., Pai R.K. A practical approach to the evaluation of gastrointestinal tract carcinomas for Lynch syndrome. *Am J Surg Pathol* 2016;40(4):e17–34. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000620
50. Chang C.L., Marra G., Chauhan D.P. et al. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(1):C148–54. DOI: 10.1152/ajpcell.00422.2001
51. Mihaylova V.T., Bindra R.S., Yuan J. et al. Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2003;23(9):3265–73. DOI: 10.1128/MCB.23.9.3265-3273.2003
52. Dhar S.S., Ruiz-Garcia E., Barresi V., Brunetti O. Molecular mechanisms and targeted therapies for colorectal cancer. *Frontiers Media SA*, 2022.
53. Graham R.P., Kerr S.E., Butz M.L. et al. Heterogenous MSH6 loss is a result of microsatellite instability within MSH6 and occurs

- in sporadic and hereditary colorectal and endometrial carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2015;39(10):1370–6. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000459
54. Shia J., Zhang L., Shike M. et al. Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunoeexpression of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency. *Mod Pathol* 2013;26(1):131–8. DOI: 10.1038/modpathol.2012.138
55. Dudley B., Brand R.E., Thull D. et al. Germline MLH1 mutations are frequently identified in Lynch syndrome patients with colorectal and endometrial carcinoma demonstrating isolated loss of PMS2 immunohistochemical expression. *Am J Surg Pathol* 2015;39(8):1114–20. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000425
56. Rosty C., Clendenning M., Walsh M.D. et al. Germline mutations in PMS2 and MLH1 in individuals with solitary loss of PMS2 expression in colorectal carcinomas from the Colon Cancer Family Registry Cohort. *BMJ Open* 2016;6(2):e010293. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-010293

Вклад авторов

Кудайбергенова А. Г.: сбор и обработка материала, написание текста;

Сендерович А. И.: сбор и обработка материала;

Горбань Н. А.: идея статьи, редактирование.

Contribution of the authors

Kudaibergenova A. G.: collecting and processing material, writing text;

Senderovich A. I.: collection and processing of material;

Gorban N. A.: article idea, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Кудайбергенова А. Г. / Kudaibergenova A. G.: <https://orcid.org/0000-0001-7797-088X>

Сендерович А. И. / Senderovich A. I.: <https://orcid.org/0000-0003-2213-5785>

Горбань Н. А. / Gorban N. A.: <https://orcid.org/0009-0001-2401-1746>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.