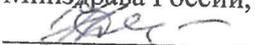


**ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ**

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист по медицинской генетике города Москвы, заведующий кафедрой медицинской генетики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, гл. науч. сотр. отдела информационных технологий и мониторинга врожденных пороков развития ОСП НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, д.м.н.

 Демикова Н.С.
«21» октября 2025г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Региональной общественной организацией «Московским обществом медицинских генетиков» д.м.н., председатель РОО «Московское общество медицинских генетиков», руководитель отдела лабораторной генетики, г.н.с. ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России

Цуканов А.С.



**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ТЕСТИРОВАНИЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ
НЕСТАБИЛЬНОСТИ/ДЕФИЦИТА БЕЛКОВ СИСТЕМЫ MMR**
Методические рекомендации № 63

УДК 616-006.04

ББК 55.6

М54

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения города Москвы»; Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Составители: А.С. Цуканов, Н.А. Савелов, Л.Э. Завалишина, Н.А. Бодунова, М.Ф. Латыпова, А.С. Чегодарь, И.А. Демидова.

Рецензенты: Доцент, заведующий кафедрой онкогенетики Института высшего и дополнительного профессионального образования ФГБНУ МГНЦ имени академика Н.П. Бочкова, к.м.н., Д.С. Михайлеко; Руководитель департамента науки ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, д.м.н., М.Ю. Федянин.

Предназначение: Данные методические рекомендации предназначены в помощь: врачам клинической лабораторной диагностики, врачам-лабораторным генетикам, врачам-генетикам, врачам-лаборантам, биологам, врачам-патологоанатомам и др. врачам-специалистам, в соответствии с Приложением приказа МЗ РФ от 2 мая 2023 г. № 205-н «Об утверждении Номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников» медицинских организаций, выполняющим на своей базе иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования.

Настоящие методические рекомендации содержат рекомендации по тестированию микросателлитной нестабильности и выявлению дефицита ферментов репарации неспаренных оснований ДНК в

патологоанатомических отделениях, клинико-диагностических и молекулярно-генетических лабораториях, занимающихся разработкой, проверкой и выполнением данных тестов.

Принято решение Экспертным советом по науке Департамента здравоохранения города Москвы и Региональной общественной организаций «Московским обществом медицинских генетиков» (Протокол № 7/1 от 22.10.2025 г.) рекомендовать: методические рекомендации к печати и последующему внедрению в практику московского здравоохранения.

Методические рекомендации по тестированию микросателлитной нестабильности/дефицита белков системы mrrg: методические рекомендации / составители: А.С. Цуканов, Н.А. Савелов, Л.Э. Завалишина [и др.]. – М.: ГБУЗ МКНЦ им. А. С. Логинова ДЗМ, 2025. – 47 с.

Авторы несут ответственность за предоставленные данные в методических рекомендациях.

ISBN:

©ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ, 2025

© Коллектив авторов, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ..... | 5 |
| ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ..... | 6 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ | |
| 1.Иммуногистохимическое исследование белков системы MMR..... | 10 |
| 2.Определение микросателлитной нестабильности методом полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом..... | 27 |
| 3.Использование высокопроизводительного секвенирования для определения микросателлитной нестабильности..... | 34 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 38 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | 40 |

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

При разработке методических рекомендаций использованы действующие нормативные документы:

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н "Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований" (с изменениями и дополнениями), вступил в силу с 1 сентября 2021 года и действует до 1 сентября 2027 года.

2. Приказ Минздрава России от 23.11.2021 N 1088н «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021

г. N 464н Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований (Зарегистрировано в Минюсте России 30.11.2021 N 66103)».

3. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. N 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 5. 3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (с изменениями и дополнениями), введены в действие с 1 сентября 2021 г. и действуют до 1 сентября 2027 г..

4. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ИГХ – Иммуногистохимическое исследование;
КРР – колоректальный рак;
МСН - микросателлитная нестабильность;
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
ИГХ - иммуногистохимическое исследование;
ПЦР - полимеразная цепная реакция;
ВПС – высокопроизводительное секвенирование;
СММРD – синдром врождённого дефицита ферментов репарации неспаренных оснований;
FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США;
FFPE – ткани, фиксированные в формалине и залитые в парафин;
MMR - система ферментов репарации неспаренных оснований ДНК;
dMMR - дефицит ферментов репарации неспаренных оснований ДНК;
pMMR - профицит ферментов репарации неспаренных оснований ДНК;
MSI – микросателлитная нестабильность (MicroSatellite Instability);
MSS – микросателлитная стабильность (MicroSatellite Stable);
Локус – местоположение гена или маркера в геноме;
Маркер – генетический элемент, используемый для анализа;
MLH1 (MutL Homolog 1) - ген системы репарации неспаренных оснований ДНК;
MSH2 (MutS Homolog 2) - ген системы репарации неспаренных оснований ДНК;
MSH6 (MutS Homolog 6) - ген системы репарации неспаренных оснований ДНК;
STR (Short Tandem Repeat) – короткие tandemные повторы (Short Tandem Repeat);
BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27, D2S123, D5S346 и D17S250 – маркеры микросателлитной нестабильности.

ВВЕДЕНИЕ

Микросателлитная нестабильность (МСН) – феномен, который был открыт при изучении опухолей толстой кишки еще в 1993 году. Микросателлиты – участки ДНК с многократно повторяющимися элементами (с шагом от 1 до 6 нуклеотидов). При репликации ДНК во время деления клеток фермент ДНК-полимераза может «проскальзывать» участки с повторяющимися нуклеотидами. Это приводит к появлению новой молекулы ДНК с измененной длиной цепи, что и является микросателлитной нестабильностью. При этом существует система исправления ошибочно спаренных оснований – Mismatch repair (MMR). Данная система включает белки MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2 и другие более редкие. Механизм работы данной системы следующий: прежде всего комплекс белков MSH2-MSH6 определяет наличие неспаренных оснований на матричной цепи ДНК (новая цепь ДНК в результате «проскальзывания» полимеразы оказывается короче), в дальнейшем к нему подходит комплекс MLH1-PMS2, после чего происходит активация экзонуклеазы, которая расщепляет неправильный участок новой цепи ДНК, а полимеразы достраивает верную нуклеотидную последовательность. Важно отметить, что довольно часто микросателлитные участки ДНК содержатся в тех генах, которые принимают самое непосредственное участие в канцерогенезе (*MSH2*, *c-kit* и др). Интересно, что цифра в названии микросателлитного маркера указывает на количество содержащихся в нем повторяющихся элементов, например, маркер BAT-25 включает 25 повторяющихся нуклеотидов Т, а BAT-26 – 26 нуклеотидов А.

В настоящее время необходимость обнаружения феномена микросателлитной нестабильности в опухолевых образцах обусловлена двумя ключевыми факторами. Прежде всего FDA уже в 2017 году одобрила применение иммунотерапии препаратом пембролизумаб у пациентов, в чьих опухолях имеется данный феномен, поскольку это дает весьма существенное преимущество как в общей, так и в безрецидивной выживаемости. А в настоящее время терапия ингибиторами контрольных точек всё чаще применяется в неоадьювантном режиме. Вторым важным аспектом целесообразности изучения МСН является скрининг пациентов с синдромом Линча. Так, среди всего колоректального рака только 3% случаев обусловлено данным синдромом, а значит, чтобы не проводить дорогостоящее молекулярно-

генетическое тестирование для поиска патогенных вариантов генов MMR всем больным, достаточно изучить наличие МСН в опухоли, а далее только в случае ее обнаружения выполнять расширенную ДНК-диагностику пациента на синдром Линча. Тут крайне важно отметить, что ранее считалось, что наличие в опухоли с МСН дополнительно соматической мутации р.V600E гена *BRAF* и/или гиперметилирования промоторного участка гена *MLH1* позволяет исключить синдром Линча, однако в настоящее время хорошо известно, что как первое, так и второе события могут встречаться (хоть и достаточно редко) в опухолях больных синдромом Линча, а, следовательно, не должны учитываться при проведении диагностического поиска такого рода пациентов.

Прямым методом диагностики микросателлитной нестабильности является молекулярно-генетическое исследование ДНК опухолевых клеток, которое можно производить либо с помощью изучения стандартной панели, включающей 5 моноклеотидных маркеров (NR21, NR24, NR27, BAT25 и BAT26) либо с помощью метода высокопроизводительного секвенирования (ВПС). При этом крайне важно подчеркнуть, что применять 5-маркерную панель, разработанную на основе опыта изучения опухолей толстой кишки, целесообразно именно для колоректального рака, а также рака желудка и рака тонкой кишки, при этом опухоли внекишечной локализации необходимо исследовать методом ВПС. Также важно подчеркнуть, что при использовании 5-маркерной панели для изучения опухолей ЖКТ нужно обязательно помнить, что в случае, когда нестабильны только 1 или даже 2 маркера из 5 – необходимо изучить образец крови или другой нормальной ткани, так как у пациента возможно носительство редких наследственных аллелей. Если же возможности изучения нормальной ткани нет, то имеет смысл применить альтернативный метод исследования (например, ВПС или метод ИГХ).

Метод иммуногистохимического исследования позволяет изучить утрату экспрессии белков MMR в опухолевом образце. При этом всегда нужно помнить следующие моменты: возможен лишь один из 4 вариантов утраты экспрессии белков MMR: парная утрата белков, которые образуют единый комплекс: MLH1/PMS2 или MSH2/MSH6; а также единичная утрата белков MSH6 или PMS2. Последние 3 варианта (утрата экспрессии MSH2/MSH6, MSH6 или PMS2) с вероятностью более, чем 90% могут быть обусловлены наличием наследственного патогенного варианта у пациента в соответствующем гене (*MSH2*, *MSH6* или *PMS2*). Если же говорить про тот случай, когда происходит утрата экспрессии пары белков MLH1/PMS2, то больше, чем в половине случаев

это обусловлено спорадическим гиперметилированием промоторного участка гена *MLH1*.

Данные методические рекомендации посвящены нюансам тестирования микросателлитной нестабильности с помощью молекулярно-генетических методов (5-маркерная панель или ВПС), а также изучению утраты экспрессии белков системы MMR методом ИГХ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Иммуногистохимическое исследование белков системы MMR.

Тестирование для выявления дефицита ферментов репарации неспаренных оснований (dMMR) и микросателлитной нестабильности (MSI) стало неотъемлемой частью рутинного диагностического обследования при колоректальном раке (КРР). Для ряда локализаций, например, для рака эндометрия, иммуногистохимическое исследование дает наиболее объективные результаты при определении наличия/отсутствия dMMR.

В настоящее время в Российской Федерации Регистрационные удостоверения для иммуногистохимического исследования маркеров MMR имеют реагенты четырех производителей «Roche Diagnostics» (Германия), ООО «ПраймБиоМед» (Россия), «Dartmon» (КНР), «Селл Марк Корпорейшн» (США).

Панель VENTANA MMR IHC (Roche Diagnostics) включает в себя 5 антител, реагент негативного контроля и в качестве системы детекции применяется система OptiView (Roche Diagnostics), а для антитела Ventana anti-PMS2 (A16-4) (760-5094) система детекции применяется в комплекте с набором для амплификации (OptiView Amplification Kit). Данные реагенты предназначены для качественного обнаружения белков системы репарации неспаренных оснований и определения наличия мутации в гене *BRAF* (p.V600E):

- Ventana anti-MLH1 (M1) (760-5091);
- Ventana anti-MSH2 (G219-1129) (760-5093);
- Ventana anti-MSH6 (SP93) (760-5092);
- Ventana anti-PMS2 (A 16-4) (760-5094);
- Ventana anti-BRAF V600E (VE1) (760-5095);
- Реагент негативного контроля Negative Control (Monoclonal) (760-2014);
- Набор для детекции OptiView DAB IHC Detection Kit (760-700);
- Набор для амплификации OptiView Amplification Kit (760-099);

Антитела предназначены для проведения исследования иммуногистохимическим методом на фиксированных формалином и залитых в парафин срезах тканей (FFPE) на иммуностейнерах BenchMark Ultra, XT, GT (Roche-Ventana). Ткань для исследования необходимо фиксировать в течение 12-48 часов при комнатной температуре в зависимости от типа материала (биопсийный или операционный).

Используемое количество фиксирующего раствора должно составлять 15-20 объемов ткани. В инструкциях производителя для каждого антитела приведены индивидуальные рекомендованные протоколы для каждого типа иммуностейнеров. Для иммуностейнера BenchMark Ultra кондиционирование проводится при 100 °С и инкубация с первичными антителами при 36 °С, а в иммуностейнерах BenchMark XT и GT - 37 °С. Время кондиционирования различается для каждого антитела и указано в инструкции к реагенту (см. Инструкции по применению на медицинские изделия «Instruction for use» Roche Diagnostics).

Отклонение от указанных в инструкциях протоколов проведения иммуногистохимических исследований, особенно на этапе демаскировки антигена («Кондиционирование клеток») может приводить к появлению недостоверных результатов.

Однако надо учитывать возможные имеющиеся различия в фиксации и обработке тканей в разных лабораториях и на различном оборудовании, которые могут приводить к изменениям в протоколе исследования на этапе инкубации с первичными антителами (увеличение или уменьшение времени инкубации). Внесение изменений в протокол (изменение времени инкубации с первичными антителами) требует обязательного проведения валидации на собственных внутрिलाбораторных контролях.

Исследование проводится на срезах толщиной 4 мкм, нанесенных на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания необходимо использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность срезов тканей при длительном хранении может уменьшиться. Одновременно с исследованием неизвестных образцов пациентов рекомендуется провести исследование на внутрिलाбораторных положительных и отрицательных тканевых контрольных образцах. Положительный тканевой контроль рекомендуется размещать вместе с образцом для исследования на одном стекле. Для оптимального контроля качества лучше всего подходит образец ткани в норме, имеющий положительное окрашивание. Для четырех антител данной панели (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) в качестве позитивного тканевого контроля рекомендуется использовать нормальную ткань толстой кишки или аппендикса. Положительный тканевой образец нормальной ткани демонстрирует различную интенсивность окрашивания ядер клеток разных типов (см. рис. 1). В случае использования ткани аппендикса с наличием лимфоидных фолликулов со светлыми зародышевыми центрами наиболее интенсивное окрашивание наблюдается в ядрах эпителиальных клеток в глубине крипт (чем ближе к зоне пролиферации, тем ярче), ядрах клеток межмышечных нервных сплетений и в светлых

зародышевых центрах лимфоидных фолликулов. Менее интенсивная реакция наблюдается в поверхностных отделах эпителия, эндотелиоцитах, фибробластах, гладкомышечных клетках, лимфоцитах зоны мантии. Положительный тканевой образец опухолевой ткани должен демонстрировать однозначное ядерное окрашивание жизнеспособных опухолевых клеток в присутствии внутренних положительных контролей, которым является ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах, нормальных эпителиальных клетках. С каждого блока ткани для исследования изготавливается два среза. Второе стекло со срезом используется для нанесения реагента негативного контроля (вместо первичных антител) для оценки неспецифического окрашивания.

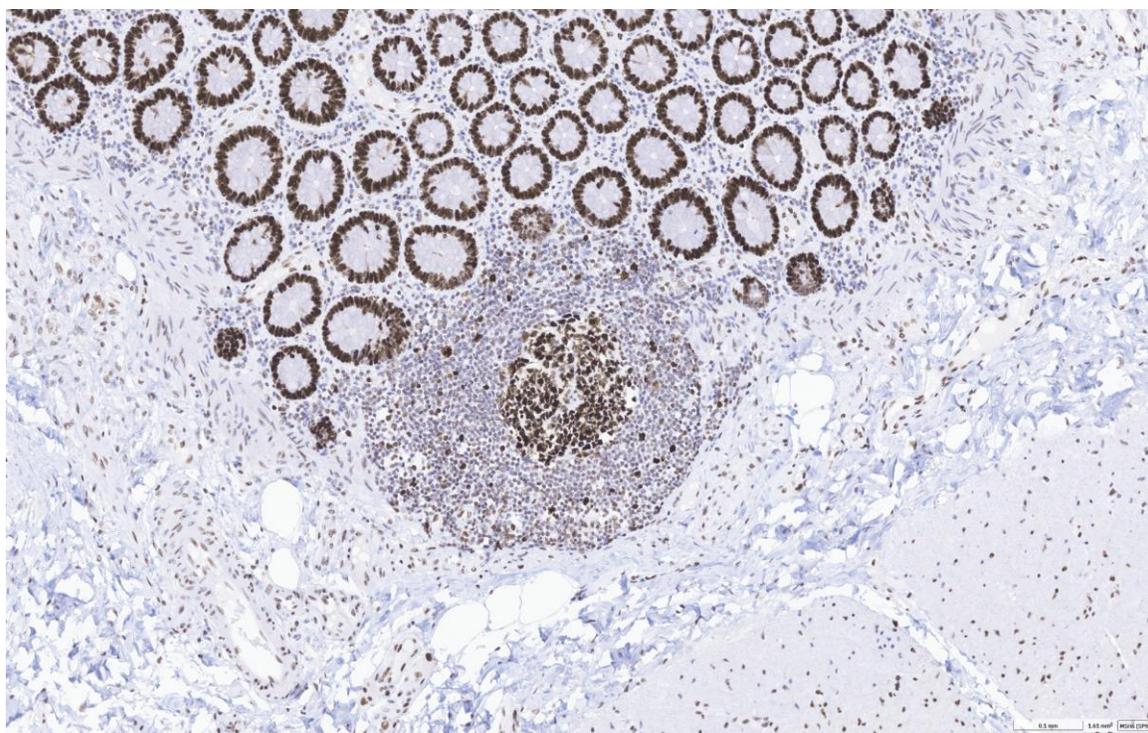


Рисунок 1. Экспрессия MSH2 в ткани аппендикса. Выраженная ядерная реакция в эпителии крипт и в лимфоцитах светлых зародышевых центров лимфоидных фолликулов. В лимфоцитах зоны мантии, эндотелиальных клетках, фибробластах и гладкомышечных клетках наблюдается слабая или умеренная ядерная реакция.

Для выявления иммуногистохимической реакции для всех антител панели VENTANA MMR IHC (Roche Diagnostics) используется всегда система детекции OptiView DAB IHC Detection Kit по закрытому протоколу. Однако для антитела Ventana anti-PMS2 (A 16-4) система детекции используется только в комплекте с системой амплификации

«Набор для амплификации OptiView Amplification Kit» в соответствии с инструкцией к набору (OV AMP H₂O₂/OVAmplifer – 4 минуты; OV AMP Multimer – 4 минуты). Отсутствие в протоколе набора для амплификации приводит к получению ложно негативных результатов окрашивания.

Необходимо отметить, что при длительном использовании открытого диспенсера с антителом анти-PMS2 (с учетом указанного срока годности антитела), может возникать необходимость корректировки протокола на этапе времени инкубации с первичным антителом с учетом качества ядерного окрашивания нормальных эпителиальных клеток, лимфоцитов, фибробластов.

Интерпретация окрашивания.

Статус dMMR или pMMR может быть присвоен опухоли после оценки наличия/отсутствия окрашивания маркеров панели MMR IHC.

Клинический статус «Неизменная экспрессия» (pMMR) получают образцы с однозначным ядерным окрашиванием жизнеспособных опухолевых клетках при наличии приемлемых внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание лимфоцитов, фибробластов, нормальных клеток эпителия, гладкомышечных клеток). Важно помнить, что в образцах с pMMR экспрессия всех четырёх белков репарации в клетках опухоли более выражена, чем в клетках внутреннего контроля (см. рис. 2). Поэтому при дефектах преаналитического этапа обработки образца ткани сначала снижается вплоть до полного исчезновения экспрессия в ядрах клеток внутреннего контроля, а затем уже в ядрах опухолевых клеток. В таких случаях исчезновении экспрессии в части опухолевых клеток нельзя расценивать как dMMR (см. рис. 3, а также рис. 9).

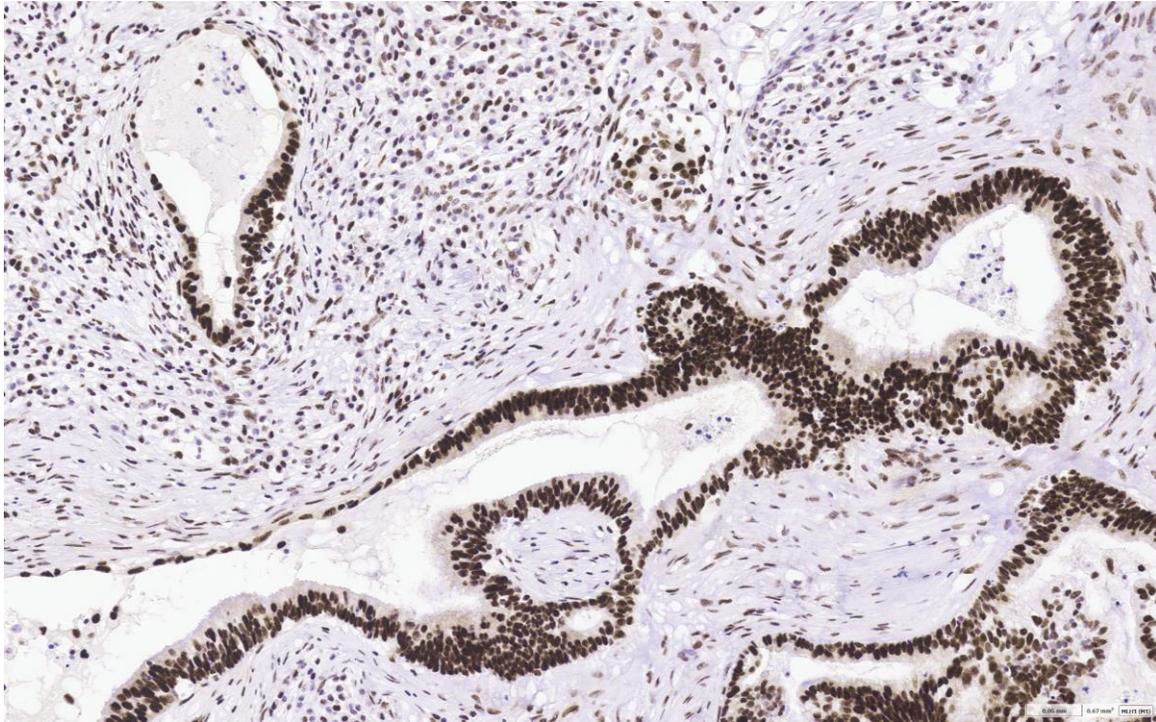


Рисунок 2. Неизменная экспрессия MLH1 (клон M1) в ткани аденокарциномы толстой кишки. Экспрессия MLH1 в ядрах опухолевых клеток выражена ярче, чем в клетках внутреннего контроля (фибробласты, лимфоциты).

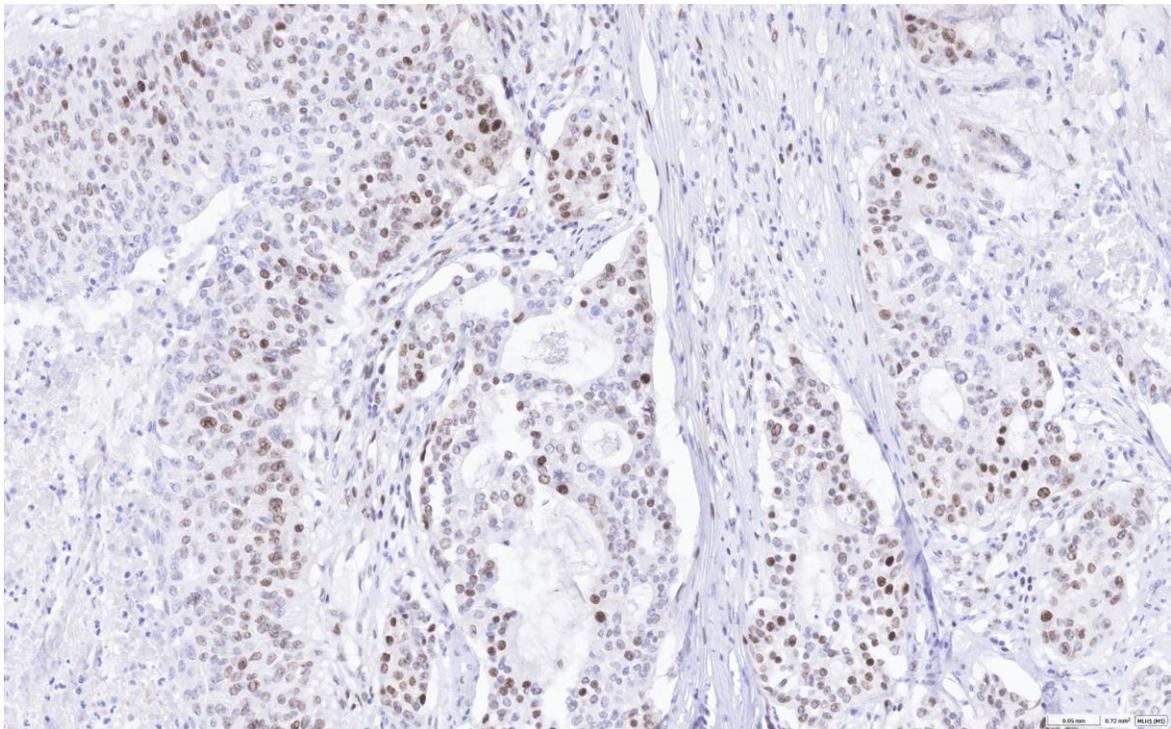


Рисунок 3. Неизменная экспрессия MLH1 (клон M1) в низкодифференцированном раке желудка в случае нарушений на преаналитическом этапе исследования. В клетках внутреннего положительного контроля (лимфоциты и фибробласты) реакция практически отсутствует, а в опухолевых клетках значительно

снижена вплоть до полного исчезновения реакции в части ядер опухолевых клеток. В этом случае говорить о потере экспрессии MLH1 (dMMR) не корректно.

Клинический Статус «Потерянная экспрессия» (dMMR) получают образцы с однозначной полной потерей ядерного окрашивания (см. рис. 4) или с фокальным слабым неоднозначным ядерным окрашиванием в небольшой части жизнеспособных клеток опухоли в присутствии более выраженной ядерной экспрессии в клетках внутренних положительных контролей (см. рис. 5). Важно помнить, что порогового значения для процента позитивных ядер опухолевых клеток при оценке статуса белков системы MMR не существует. Тест носит исключительно качественный характер за счёт того, что происходит сравнение интенсивности окрашивания ядер опухолевых клеток и нормального тканевого контроля (лимфоциты, фибробласты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки).

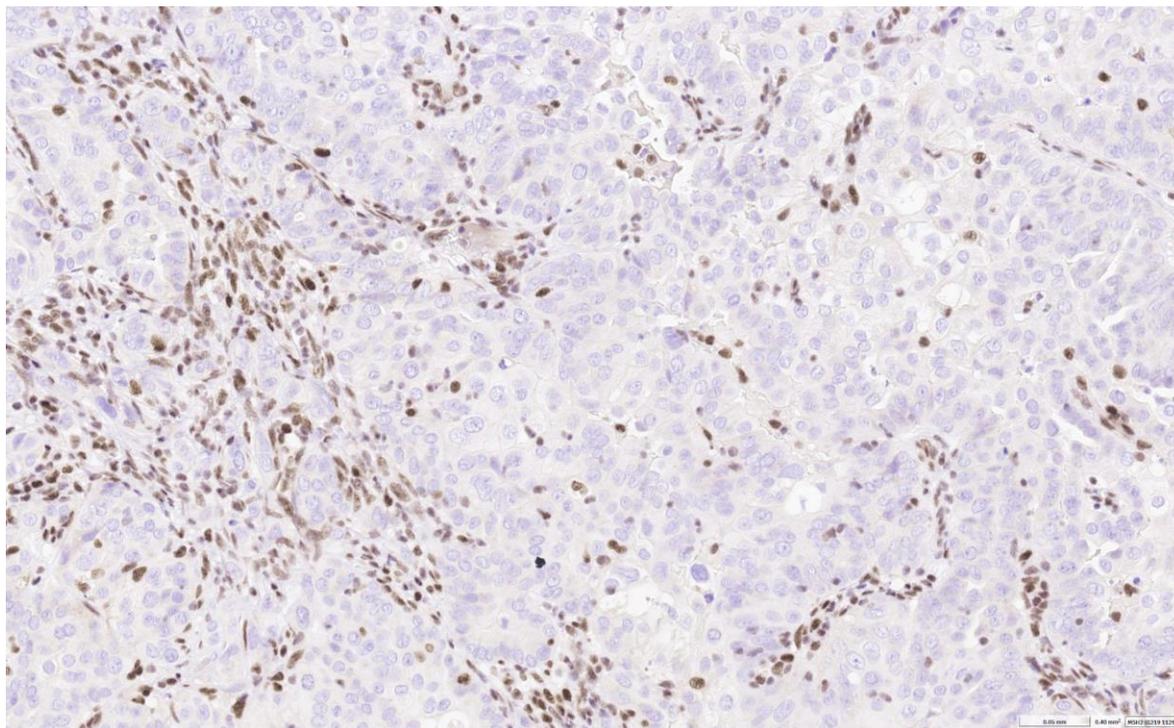


Рисунок 4. Потеря экспрессии MSH2 (клон G219 1129) в ткани аденокарциномы толстой кишки. Экспрессия в клетках внутреннего положительного контроля (лимфоциты и фибробласты) сохранена.

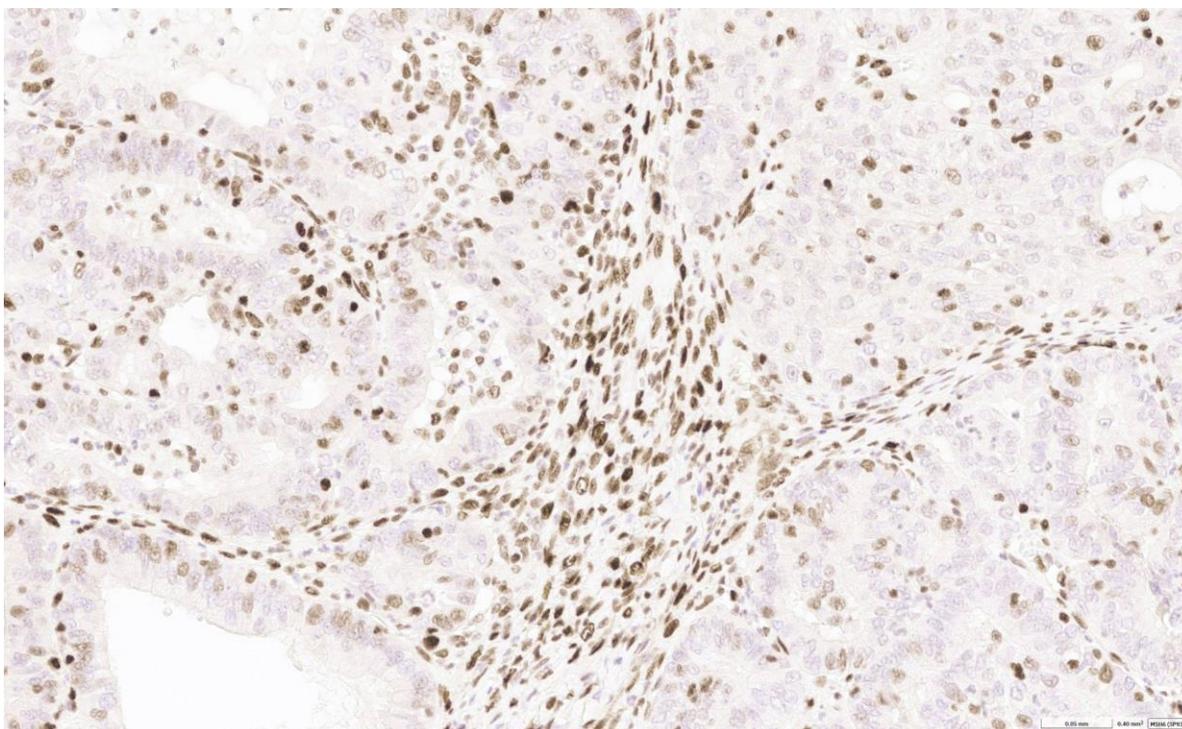


Рисунок 5. Потеря экспрессии MSH6 (клон SP93) в ткани аденокарциномы толстой кишки у пациента с синдромом Линча. Видна слабая очаговая экспрессия в части опухолевых клеток. Экспрессия в клетках внутреннего положительного контроля (лимфоциты и фибробласты) значительно более интенсивная.

Анализ наличия/отсутствия позитивной иммуногистохимической реакции для каждого маркера из панели VENTANA MMR IHC (Roche Diagnostics) может быть иногда затруднен в связи с наличием ряда объективных проблем:

- наличие фонового неспецифического окрашивания – обязательно сравнение предметного стекла с образцом ткани, на которой нанесены первичные антитела с образцом ткани, на который нанесен реагент негативного контроля. Наличие цитоплазматического окрашивания не принимается во внимание при оценке реакции (см. рис. 6);

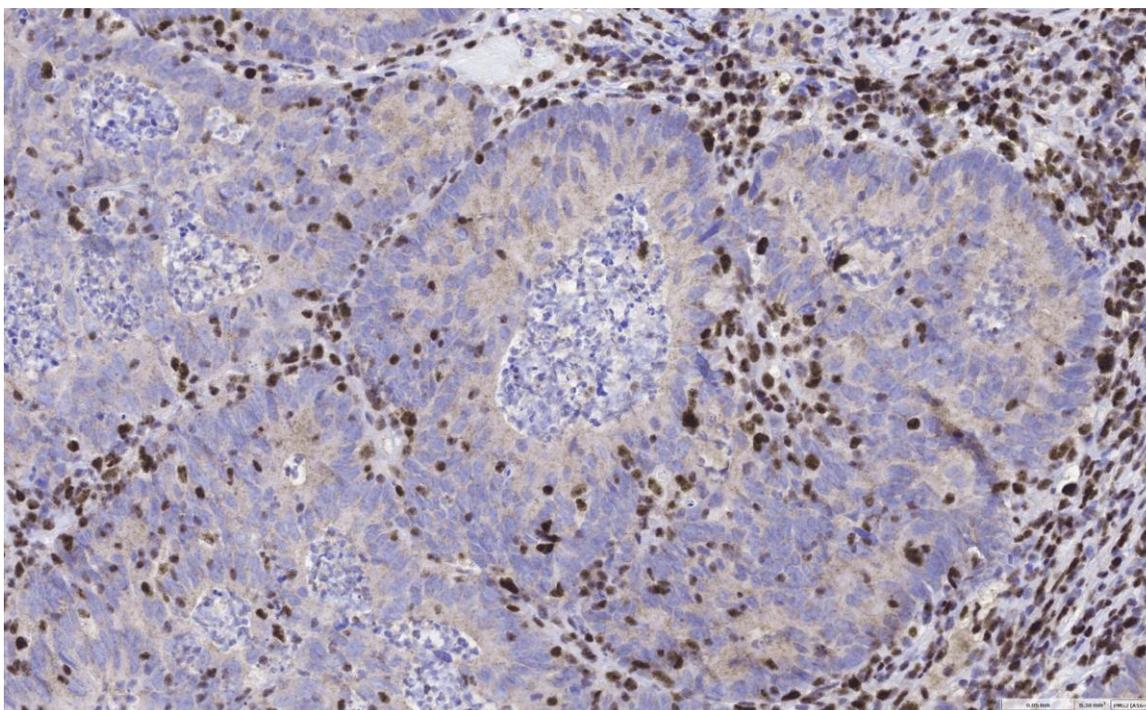


Рисунок 6. Потеря экспрессии PMS2 (клон A16-4) в аденокарциноме кишки. Слабое фоновое окрашивание цитоплазмы опухолевых клеток не учитывается. Отчетливо видна выраженная экспрессия PMS2 в клетках внутреннего положительного контроля – в ядрах опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов.

- наличие точечного дискретного окрашивания в ядрах опухолевых клеток при использовании антител к MLH1 клона M1 с системой детекции OptiView (Roche Diagnostics) не принимается во внимание при оценке реакции. Наличие только такого вида окрашивания оценивается как потеря экспрессии (см. рис. 7). Следует помнить, что изолированная потеря экспрессии MLH1 не наблюдается в опухолях человека, она всегда сопровождается потерей экспрессии PMS2 независимо от характера молекулярных нарушений. Поэтому в случае гранулярного ядерного паттерна окрашивания с антителами клона M1 и системой детекции OptiView (Roche Diagnostics) необходимо изучить экспрессию PMS2;

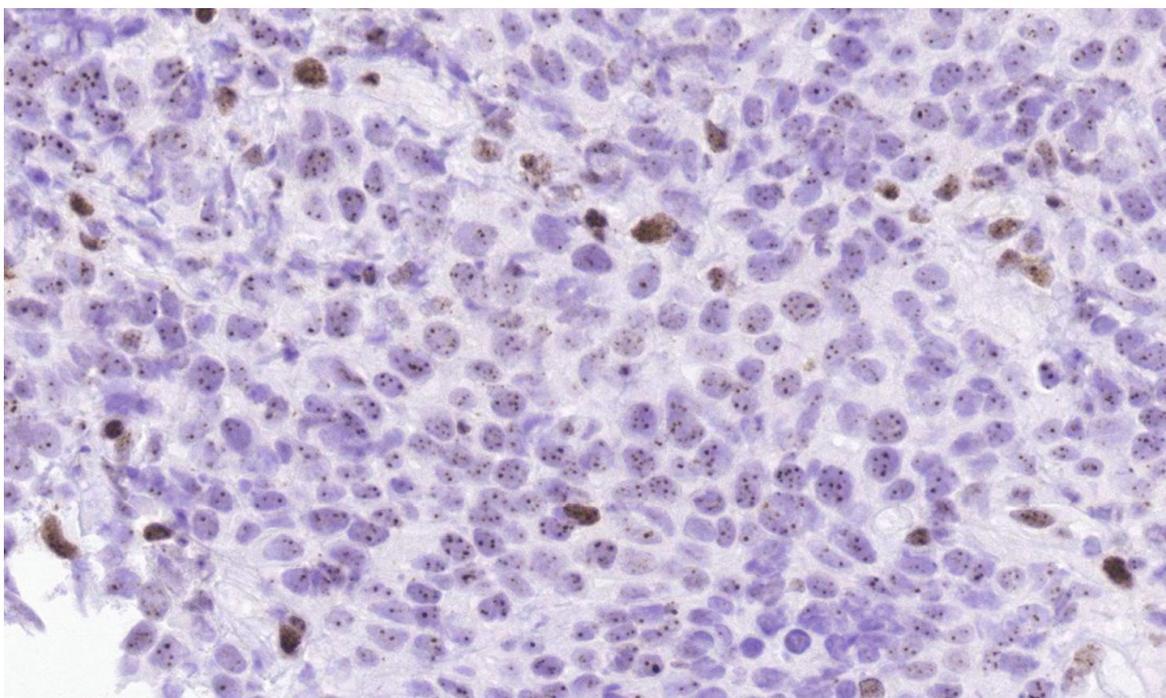


Рисунок 7. Потеря экспрессии MLH1 (клон M1) в ткани низкодифференцированной аденокарциномы толстой кишки. Наблюдается искусственное гранулярное ядерное окрашивание в опухолевых клетках, характерное для клона M1 с системой детекции OptiView (Roche Diagnostics). В клетках внутреннего позитивного контроля выявлена гомогенная умеренная/выраженная ядерная реакция.

- наличие гетерогенного окрашивания ядер опухолевых клеток. Как было отмечено ранее, фокальное слабое неоднозначное окрашивание ядер опухолевых клеток при наличии яркого окрашивания ядер клеток внутреннего позитивного контроля оценивается как потеря экспрессии (см. рис. 5). Субклональное выпадение одного или нескольких белков системы MMR расценивается как потеря экспрессии – dMMR (см. рис. 8). Не следует путать подобный паттерн потери экспрессии с окраской, характерной для нарушений на преаналитическом этапе исследования. Например, с изменениями интенсивности окрашивания белков системы MMR, вызванными ограниченным аутолизом в опухолевой ткани из-за несвоевременной фиксации операционного материала (см. рис. 9). Так же важно помнить, что реакция с антителами к PMS2 любого производителя может носить гетерогенный характер и выглядеть в виде очагов с разной интенсивностью окрашивания – это не следует расценивать как потерю экспрессии, и нужно всегда сравнивать интенсивность окрашивания ядер опухолевых клеток с клетками стромы (см. рис. 10);

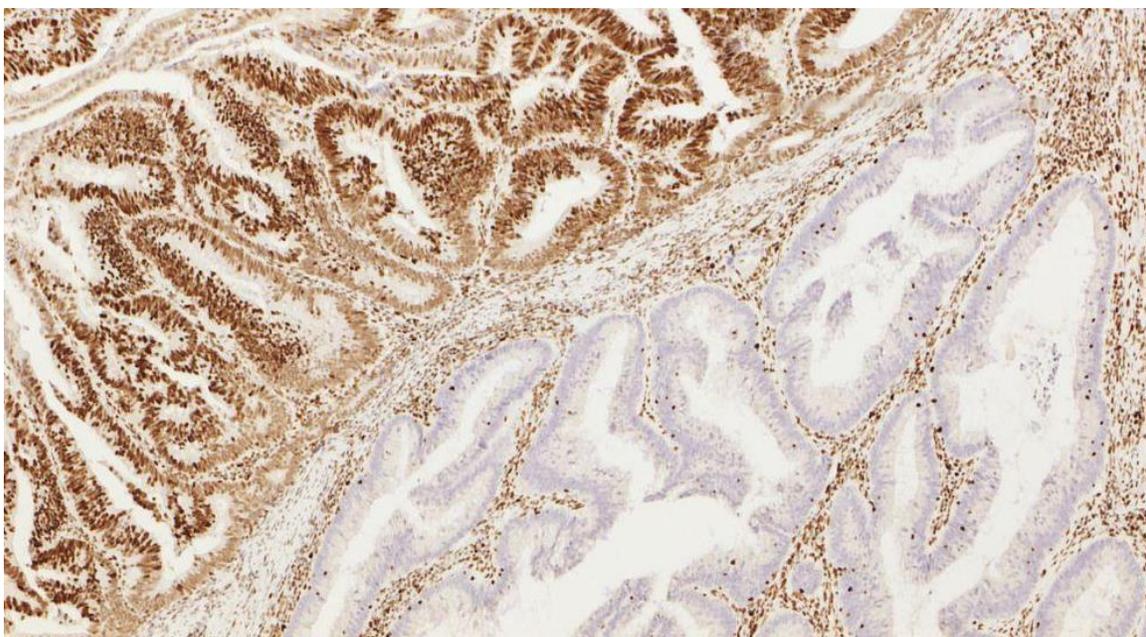


Рисунок 8. Субклональная потеря экспрессии MSH6 (клон SP93) в ткани аденокарциномы толстой кишки (внутриопухолевая гетерогенность). В одном субклоне опухолевых клеток наблюдается полная потеря ядерной экспрессии MSH6 (правая нижняя часть изображения) при сохранении выраженной ядерной экспрессии во втором субклоне (левая верхняя часть изображения).

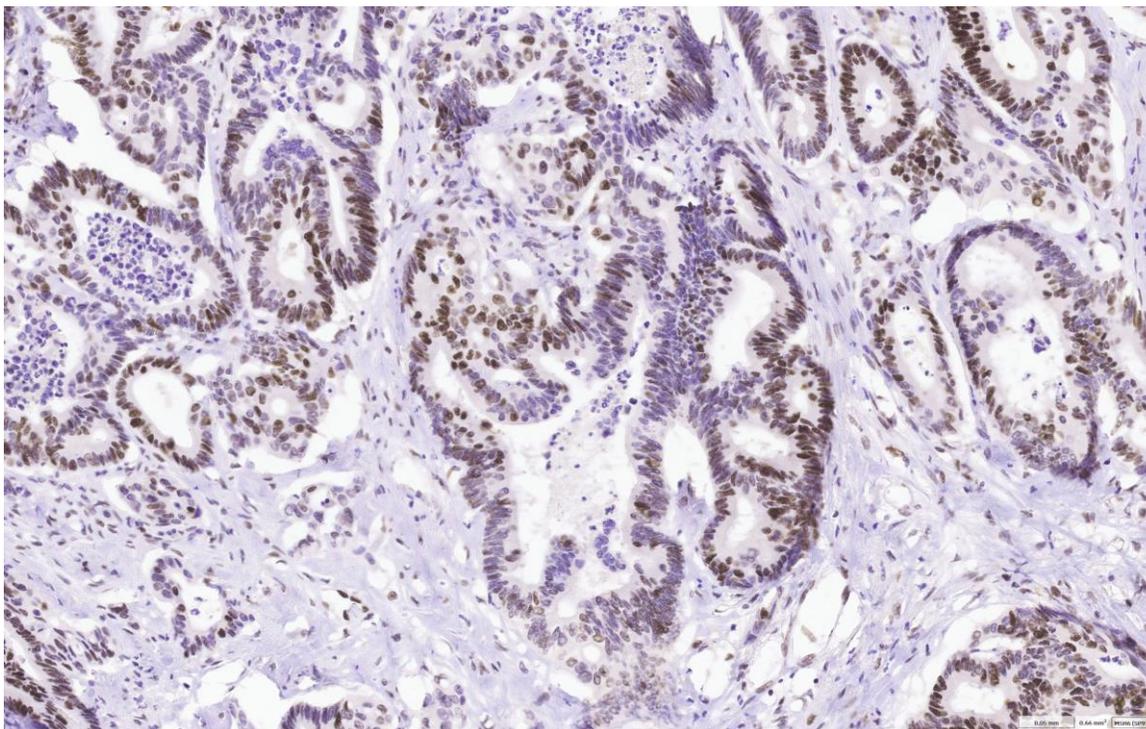


Рисунок 9. Неизменная экспрессия MSH6 (клон SP93) в ткани аденокарциномы толстой кишки. В части опухолевых клеток наблюдается частичная или полная потеря ядерной экспрессии MSH6 в результате нарушения антигенной сохранности. При этом интенсивность экспрессии MSH6 в клетках внутреннего

позитивного контроля (лимфоциты и фибробласты стромы опухоли) значительно ниже по интенсивности, чем сохранившаяся экспрессия в опухолевых клетках.

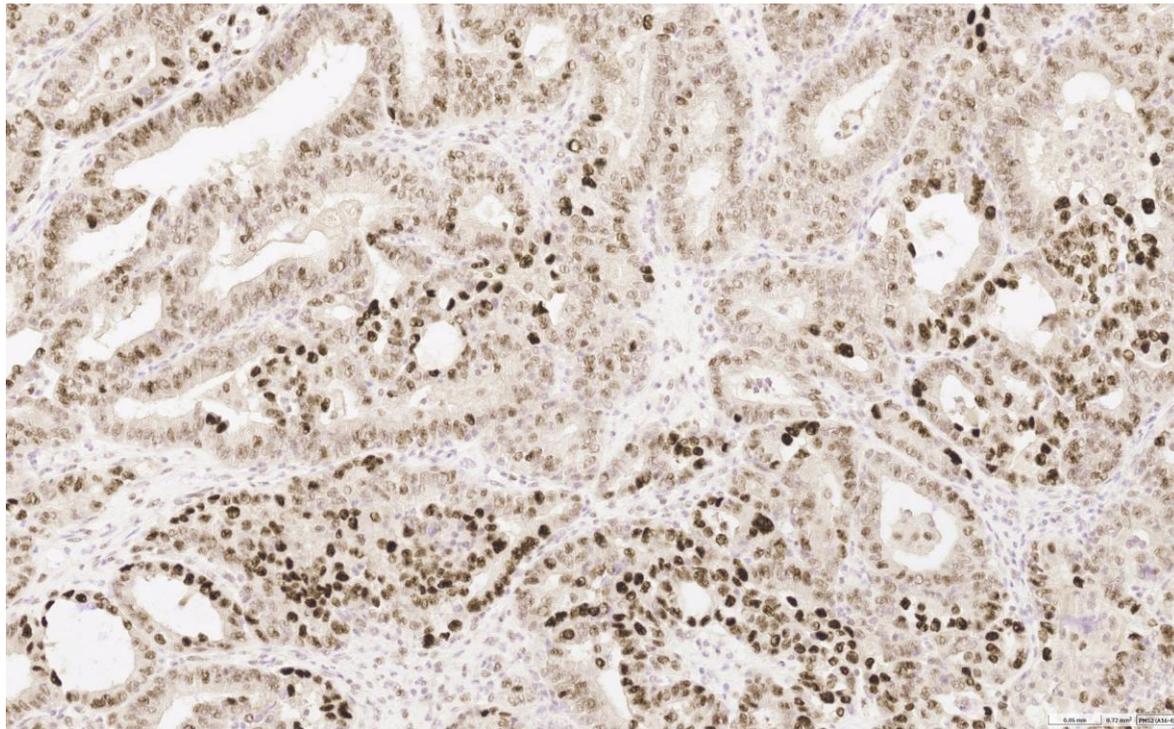


Рисунок 10. Неизменная экспрессия PMS2 (клон A16-4) в аденокарциноме кишки. Показана гетерогенность окрашивания ядер опухолевых клеток. При этом окраска ядер опухолевых клеток всегда более интенсивная чем окраска ядер клеток стромы (внутренний позитивный контроль).

- изолированное выпадение MSH6 следует интерпретировать с осторожностью так как нарушении экспрессии может не иметь генетической природы, а быть связано с нарушением регуляции гена *MSH6*, например, в результате предоперационной химиотерапии;

- артефакты, связанные с гистологической обработкой или качеством изготовления срезов для иммуногистохимического исследования (см. рис. 9).

Таким образом, при оценке окрашивания белков системы MMR исследование начинается с оценки окрашивания нормальных клеток в срезе (внутренний контроль). В опухолях с сохранной системой репарации (pMMR) ядерная экспрессия в опухолевых клетках всегда более выражена чем в стромальных (нормальный внутренний контроль) в этом же срезе. При нарушениях преаналитического этапа сначала пропадает экспрессия в стромальных клетках, а потом в опухолевых. При потере экспрессии белков репарации (dMMR) опухолевые клетки негативны, а стромальные клетки позитивны. При этом потеря белка

системы MMR может наблюдаться и в виде выраженного снижения интенсивности экспрессии по отношению к сильно окрашенному внутреннему контролю (лимфоциты, фибробласты). В этих сложных случаях возможна ложная интерпретация результата о изолированной потере белка PMS2, что может приводить к гипердиагностике синдрома Линча с учетом сложностей исследования мутаций в гене *PMS2*. Поэтому в таких сложных неоднозначных случаях потери экспрессии, выявляемых иммуногистохимическим методом, рекомендуется молекулярно-генетическое исследование.

Следует помнить, что потеря экспрессии белков репарации неспаренных оснований подчиняется четким закономерностям - в рутинной практике встречается всего 4 паттерна истинного выпадения экспрессии белков системы MMR: пара *MLH1/PMS2*, пара *MSH2/MSH6*, изолированно *PMS2*, изолированно *MSH6*. Существуют и другие, более редкие паттерны: выпадение экспрессии трёх белков – пары *MLH1/PMS2* и белка *MSH6* (например, описано метилирование промотора гена *MLH1* и соматическая мутация в гене *MSH6*), потеря экспрессии всех четырех белков системы MMR при синдроме Линча (феномен связан с последовательной double-hit инактивацией гена *MSH2* и метилированием промотора гена *MLH1*) или спорадически (комбинация метилирования промотора гена *MLH1* и соматической мутации гена *MSH2*), изолированная потеря экспрессии белков *MLH1*, или *PMS2*, или *MSH6* во всех клетках в пределах тканевого образца пациента (как в нормальных, так и в опухолевых) при CMMRD. Однако существуют и запрещённые комбинации – невозможно, например, выпадение комбинации *MSH2* и *PMS2* так как эти белки не образуют функциональную пару. Для опухолей с субклональной потерей окрашивания (внутриопухолевая гетерогенность) рекомендуется проводить молекулярное исследование после макродиссекции тканевого образца. При нетипичной комбинации выпадения белков или потере экспрессии только одного из белков системы репарации, рекомендуется проведение исследования молекулярно-генетическими методами в том числе изучение наличия мутаций в экзонуклеазном домене генов *POLE* и *POLD*.

Также для колоректального рака при потере экспрессии пары *MLH1/PMS2* возможно проведение иммуногистохимического исследования с антителом Ventana anti-BRAF V600E (VE1).

Панель для определения микросателлитной нестабильности производства ООО «ПраймБиоМед» также предназначена для работы с тканями, фиксированными в формалине и залитыми в парафин (FFPE). Исследование рекомендуется проводить на парафиновых срезах

толщиной 4 мкм. При работе с замороженными срезами или клеточными препаратами оптимальный протокол подбирается индивидуально в каждой лаборатории. Панель включает в себя антитела к 4 белкам системы репарации неспаренных оснований и систему детекции:

1. «Реагент для выявления белка MLH1 (клон GM011) в тканях человека иммуногистохимическими методами по ТУ 21.20.23-010-17782202-2021»;

2. «Реагент для выявления белка MSH2 (клон PBM-01R) в тканях человека иммуногистохимическими методами по ТУ 21.20.23-013-17782202-2022»;

3. «Реагент для выявления белка MSH6 (клон PBM – 6F12) в тканях человека иммуногистохимическими методами по ТУ 21.20.23-011-17782202-2021»;

4. «Реагент для выявления белка PMS2 (клон PBM-02R) в тканях человека иммуногистохимическими методами по ТУ 21.20.23-012-17782202-202»;

5. «Набор реагентов Универсальная двухстадийная система детекции PrimeVision (антитела к IgG мыши/кролика - HRP/DAB) для проведения иммуногистохимических исследований».

Подробные инструкции для работы с этими реагентами размещены на сайте ООО «ПраймБиоМед» www.primebiomed.ru.

Данные антитела производятся в формате как готовых к разведению, так в виде концентрированного раствора:

10-310018-7: раствор антител, готовый к использованию;

10-310018-01, 10-310018-05, 10-310018-1: концентрированный раствор антител.

При использовании концентрированных антител необходимо провести разведение антител в пропорции 1:100, используя разбавитель антител. Оптимальное разведение может варьировать в зависимости от исследуемого образца и используемой системы детекции, и должно определяться заново в каждом отдельном случае в каждой лаборатории.

Для всех антител производитель рекомендует высокотемпературную демаскировку с использованием трис-ЭДТА буфера, pH 9,0. Визуализация иммуногистохимической реакции проводится с использованием системы детекции «Набор реагентов Универсальная двухстадийная система детекции PrimeVision (антитела к IgG мыши/кролика - HRP/DAB) для проведения иммуногистохимических исследований» на основе протокола, предложенного производителем.

«Набор реагентов Универсальная двухстадийная система детекции PrimeVision (антитела к IgG мыши/кролика - HRP/DAB) для проведения иммуногистохимических исследований».

| | | | |
|----|---|--|--|
| 1. | Реагенты для депарафинизации и регидратации (например, ксилол, изопропанол) | Подготовка ткани: Депарафинизация и регидратация тканевого среза | - |
| 2. | Буфер для демаскировки антигена | Подготовка ткани: Температурная или ферментативная демаскировка антигена (по необходимости) | - |
| 3. | Раствор для блокировки эндогенной пероксидазы | Блокировка эндогенной пероксидазы | В соответствии с инструкцией производителя |
| 4. | Раствор для блокировки неспецифического связывания антител | Блокировка неспецифического связывания антител | В соответствии с инструкцией производителя |
| 5. | Первичные антитела мыши или кролика | Инкубация с первичными антителами | В соответствии с инструкцией производителя |
| 6. | Промывочный буфер (PBS-T или TBS-T буфер) | Промывка | 2 x 5 мин |
| 7. | Система детекция, шаг 1, Энхансер | Подготовка к нанесению поликонъюгата | 15 мин |
| 8. | Промывочный буфер (PBS-T или TBS-T буфер) | Промывка | 2 x 5 мин |
| 9. | Система детекции, шаг 2, Поли-HRP конъюгат | Инкубация с поликонъюгатом антител с пероксидазой хрена | 30 мин |

| | | | |
|-----|---|---|-----------|
| 10. | Промывочный буфер (PBS-T или TBS-T буфер) | Промывка | 2 x 5 мин |
| 11. | <i>Субстрат + хромоген</i> | Инкубация с рабочим раствором субстрат + хромоген | 8 мин |
| 12. | Дистиллированная вода | Промывка | 2 x 2 мин |
| 13. | Гематоксилин | Докрашивание ядер | 1-5 мин |
| 14. | Дистиллированная/водопроводная вода | Промывка | - |
| 15. | Реагенты для дегидратации (например, изопропанол, ксилол) и среда для заключения препаратов | Дегидратация и заключение препаратов | - |

Применение данных антител имеет некоторые ограничения, поскольку они рекомендованы производителем только для использования в ручных методах окраски и системой детекции «Универсальная двухстадийная система детекции PrimeVision (антитела к IgG мыши/кролика – HRP/DAB) для проведения иммуногистохимических исследований», производства ООО «ПраймБиоМед». При использовании в автоматических системах окраски оптимальный протокол подбирается индивидуально в каждой лаборатории.

Также для контроля протокола исследования рекомендуется на предметное стекло вместе с образцом пациента монтировать срез образца внутрилабораторного положительного контроля.

Для определения наличия/отсутствия ядерного окрашивания в клетках опухоли и статуса dMMR/MSI-H опухоли применяются те же подходы, как и при работе с антителами панели VENTANA MMR IHC (Roche-Ventana) с учетом наличия адекватного ядерного окрашивания клеток, являющимися внутренним контролем.

В 2025 г. были получены регистрационные документы для иммуногистохимической панели антител для определения dMMR/pMMR статуса опухолей производства компании «DARTMON» КНР: Панель первичных моноклональных антител для определения

дефицита белков системы репарации неспаренных оснований иммуногистохимическим методом в диагностики *in vitro* для ручного или автоматического использования, 4 шт./уп. в вариантах исполнения 3 мл, 6 мл, 10 мл («Панель dMMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) DMRD 0362»). Подробная инструкция к антителам при использовании системы визуализации DARTMON отражена в карточке медицинского изделия в Реестре медицинских изделий РЗН (<https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch>) и указывать Регистрационный номер медицинского изделия (Для панели MMR: РЗН 2024/24157) и на официальном сайте ООО «БиоВитрум» (<https://biovitrum.ru/upload/iblock/7a2/7bb38azlrzjqfjf0nqom0w5hv1qkbyw7.pdf>) Антитела в панели поставляются готовые к применению и не требуют разведения, фасовки представлены в 3х вариантах исполнения на 3, 6 и 10 мл.

Для панели антител производитель рекомендует высокотемпературную демаскировку с использованием трис-ЭДТА буфера, рН9,0.

Применение данных антител возможно как в автоматических иммуностейнерах, так и ручным методом. При использовании панели в автоматических стейнерах Dartmon применение возможно с системой детекции - Набором реагентов для детекции клеток-мишеней (антигенов) при проведении иммуногистохимических исследований для диагностики *in vitro* (Immunochromogenic Reagent), в вариантах исполнения (РУ РЗН 2024/23642 от 13.09.2024). При использовании ручным методом данная панель была валидирована с использованием Набором реагентов для детекции клеток-мишеней (антигенов) при проведении иммуногистохимических исследований для диагностики *in vitro* (Immunochromogenic Reagent), в вариантах исполнения (РУ РЗН 2024/23642 от 13.09.2024) и с Реактивами "in vitro" для иммуногистохимических исследований (ФСЗ 2010/08079).

При использовании в автоматических системах окраски других производителей, а также ручным методом, с использованием систем визуализации других производителей, оптимальный протокол подбирается индивидуально в каждой лаборатории.

С каждым циклом окрашивания необходимо использовать контрольные ткани. Используемая в качестве контроля ткань может содержать как позитивно, так и негативно окрашивающиеся клетки или компоненты. Такая ткань может использоваться в качестве и положительного, и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Контроли следует

подготовить по точно такой же процедуре, что используется для исследуемых образцов.

Характер окрашивания клеток для первичных кроличьих моноклональных антител для обнаружения белков MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 - ядерный.

Для панели антител для определения dMMR/pMMR характерно хорошее яркое однородное окрашивание ядер нормальных и опухолевых клеток, эффект гранулярного окрашивания для антитела MLH1 не наблюдается, что позволяет упростить интерпретацию результатов.

Антитела производителя Селл Марк Корпорейшн, США (Реактивы "in vitro" для иммуногистохимических исследований, РУ ФСЗ 2010/08079) представлены четырьмя отдельными антителами:

167. Мышиные моноклональные антитела к MLH-1 - MLH-1 Mouse Monoclonal Antibody -фл., конц. (мл) 0,1; 0,5; 1,0 RTU мл 1,0; 7,0

168. Мышиные моноклональные антитела к MSH-2 - MSH-2 Mouse Monoclonal Antibody -фл., конц. (мл) 0,1; 0,5; 1,0 RTU мл 1,0; 7,0

169. Мышиные моноклональные антитела к MSH-6 - MSH-6 Mouse Monoclonal Antibody -фл., конц. (мл) 0,1; 0,5; 1,0 RTU мл 1,0; 7,0

202. Мышиные моноклональные антитела к PMS2 - PMS2 Mouse Monoclonal Antibody -фл., конц. (мл) 0,1; 0,5; 1,0 RTU мл 1,0; 7,0

Антитела имеют 5 фасовок: 0,1; 0,5; 1,0 мл – концентрированная форма и 1,0; 7,0 мл – готовые к применению (RTU).

Рекомендации по разведению и протоколам использования можно найти на сайте производителя <https://www.cellmarque.com/cms/index.php>, информацию по использованию антител на платформах можно найти на сайте UK NEQAS <https://ukneqasiccish.org/best-methods/>, а также на сайте NordiQC (<https://www.nordiqc>)

2. Определение микросателлитной нестабильности методом полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом.

Полимеразная цепная реакция с последующим фрагментным анализом продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза является наиболее распространенным молекулярно-генетическим методом диагностики микросателлитной нестабильности,

выявляющим отличия в числе повторов в STR между опухолевыми и нормальными клетками. С 1997 г. использовалась т.н. панель Bethesda, которая включала 2 мононуклеотидных маркера (BAT25 и BAT26), а также 3 динуклеотидных маркера (D2S123, D5S346, D17S250), длины которых сравнивали в образцах ДНК из опухолевой и нормальной тканей. С 2004 г. широкое распространение получила более совершенная панель, включающая 5 квазимономорфных мононуклеотидных маркеров (BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27) и не требующая исследования ДНК нормальной ткани в качестве контроля.

Молекулярно-генетическая диагностика микросателлитной нестабильности включает два основных этапа: амплификацию микросателлитных маркеров с помощью полимеразной цепной реакции и анализ длины фрагментов. Первоначально анализ длины фрагмента проводился с помощью полимеразной цепной реакции с последующим гель-электрофорезом ДНК-фрагментов. Однако данный метод был довольно трудоемким, длительным и обладал низкой точностью. Со временем на смену гель-электрофорезу пришел новый метод - капиллярный электрофорез амплифицированных ПЦР-продуктов, который на сегодняшний день считается «золотым стандартом» в обнаружении MSI.

Исследование микросателлитной нестабильности при различных типах злокачественных новообразований подчеркивает сложность и многообразие механизмов, вовлеченных в развитие опухолей. Уникальное распределение микросателлитных повторов (STR) в геномах различных злокачественных опухолей демонстрируют ограничение по применению универсальной панели из 5 микросателлитов. Таким образом, панель BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27, разработанная на основе обширного изучения опухолей толстой кишки, оказывается наиболее целесообразной для диагностики колоректального рака, а также для рака желудка и рака тонкой кишки. Однако ее информативность для других нозологий, таких как эндометриоидный рак, рак поджелудочной железы, глиомы и т.д., может быть существенно снижена. Исследования, направленные на подбор оптимального количества маркеров, обеспечивающих максимальную чувствительность и специфичность определения MSI, показали, что для большинства опухолей ЖКТ достаточно исследовать от 1 до 7 индивидуальных маркеров, тогда как для многих других разновидностей опухолей может оказаться целесообразным расширение данной панели, что повысит точность и предсказуемость ответа на иммунотерапию. В связи с этим опухоли, располагающиеся вне кишечной локализации, следует исследовать с применением методов ВПС.

Морфологическое исследование опухолевой ткани с целью оценки качества и содержания опухолевой ткани, гистологической структуры, степени дифференцировки, клеточной инфильтрации - является критически важной, поскольку она обеспечивает основу для дальнейшего молекулярно-генетического исследования и могут влиять на выбор метода исследования и интерпретацию результатов. Для исследования микросателлитной нестабильности методом полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом необходимо оценивать содержание опухолевых клеток в фрагменте ткани заключенной в парафиновый блок: оптимально - не менее 50 %. Если в образце менее 50 % опухолевых клеток, то необходимо проводить макро- или микродиссекцию для увеличения содержания опухолевых клеток в образце (разметку препарата с обратной стороны предметного стекла, отметив границы зоны опухоли). При отсутствии возможности проведения диссекции следует отказаться от проведения исследования молекулярно-генетическим методом. Рекомендуется избегать присутствия в исследуемом материале сгустков крови, так как это может приводить к ингибированию ПЦР и снижению общей чувствительности метода. Хранить и транспортировать парафиновые блоки (FFPE) необходимо при температуре от 15°C до 25°C в индивидуальном пакете, предотвращающим контаминацию образцов чужеродной ДНК.

Исследование микросателлитной нестабильности методом полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом включает следующие этапы:

I. Экстракция ДНК

Для экстракции ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ реагенты, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот (ДНК) из клинического биоматериала в парафиновых блоках (FFPE) для ПЦР-диагностики, например, набор реагентов для выделения QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Хильден, Германия). Экстракция ДНК производится согласно инструкции производителя набора. Предпочтение следует отдавать наборам реагентов для пробоподготовки, позволяющим удалить ингибиторы ПЦР из образца.

II. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК и фрагментного анализа полученных ПЦР продуктов методом капиллярного электрофореза

На территории Российской Федерации официально разрешены к применению два вида диагностических реагентов для выявления микросателлитной нестабильности методом ПЦР. Регистрационные удостоверения Росздравнадзора получили наборы от отечественных и

зарубежных производителей: российской компании “Гордиз” и бельгийской фирмы ООО “Биокартис НВ”.

Для проведения амплификации исследуемых локусов ДНК необходимо приготовить реакционную смесь, запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации, согласно инструкции производителя набора реагентов. По окончании выполнения программы амплификации приступить к этапу проведения капиллярного электрофореза полученных ПЦР продуктов.

Для проведения фрагментного анализа полученных ПЦР продуктов методом капиллярного электрофореза необходимо выполнить предварительную настройку прибора, создание протокола и запуск анализатора, согласно инструкции производителя реагентов. Рекомендовано использовать оборудование, указанное производителем в инструкции к набору.

III. Анализ и интерпретация результатов.

В зависимости от набора реагентов, анализ кривых флуоресцентного сигнала может проводиться как в четырех различных каналах детекции, так и с меньшим числом флюорофоров. Это возможно из-за различной длины фрагментов исследуемых локусов (Таблица 1). Основной принцип интерпретации результатов основан на анализе морфологии кривых флуоресцентного сигнала.

| Маркеры MSI | Структура повтора | Диапазон длины амплифицируемого фрагмента (пар нуклеотидов) |
|-------------|-------------------|---|
| NR-21 | (A)21 | 181-184 |
| NR-24 | (A)24 | 131-134 |
| NR-27 | (A)27 | 87-90 |
| BAT-25 | (A)25 | 158-161 |
| BAT-26 | (A)26 | 120-123 |

Таблица 1. Диапазон длины амплифицируемых фрагментов.

Для начала необходимо убедиться, что все данные получены корректно. Это проверяется по наличию всех фрагментов размерного стандарта, которые должны быть четко видны в соответствующем канале детекции (см. рис. 11). Если отсутствует хотя бы один из фрагментов стандарта, результаты считаются недостоверными или результаты любого из исследуемых маркеров в пробе с положительным контролем не совпадают с ожидаемыми значениями, отсутствует сигнал

амплификации в положительном или отрицательном контроле, то требуется повторное исследование образца.

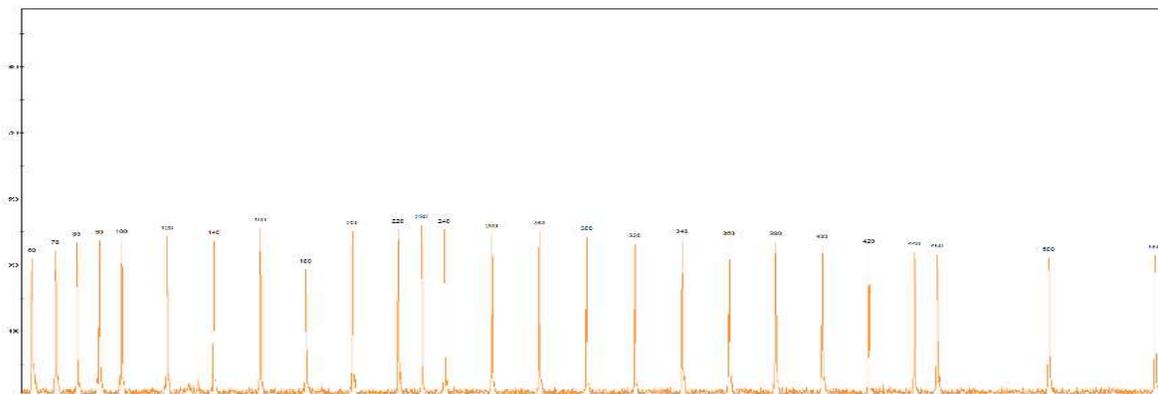


Рисунок 11. Размерный стандарт.

Наличие микросателлитной нестабильности - MSI:

- Характеризуется наличием более одного максимума в распределении интенсивности сигнала. Пример такого распределения показан на рисунке (см. рис. 12).
- Это указывает на наличие различных аллельных вариантов

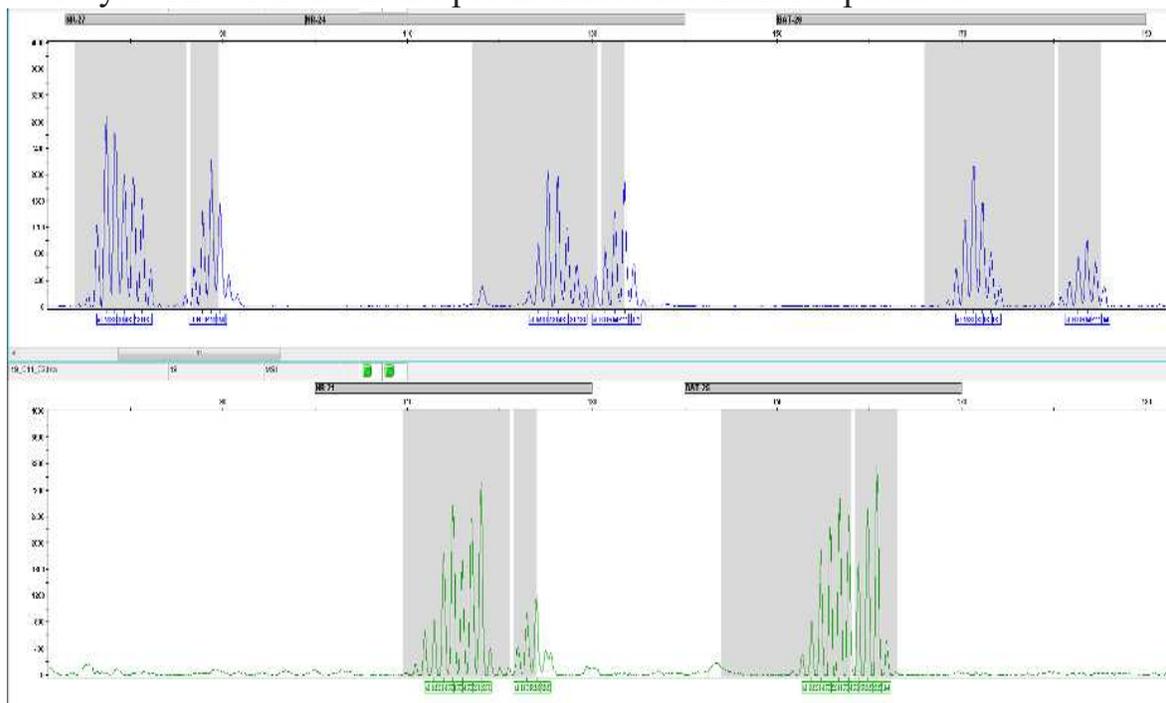


Рисунок 12. Пример микросателлитной нестабильности - MSI.

Отсутствие микросателлитной нестабильности - MSS:

- Проявляется в виде одного четкого максимума. Пример такого распределения показан на рисунке (см. рис. 13).

- Свидетельствует о гомогенности амплифицированных фрагментов

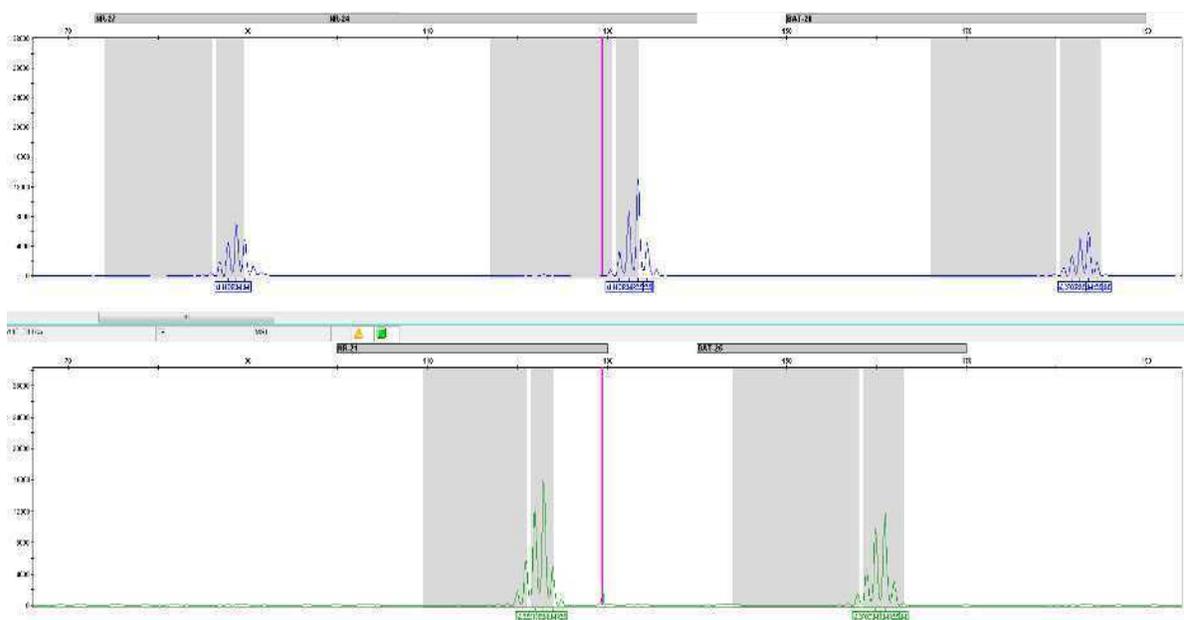


Рисунок 13. Пример отсутствия микросателлитной нестабильности - MSS.

При интерпретации результатов важно:

- Учитывать данные всех каналов детекции;
- Проверять соответствие полученных сигналов ожидаемым диапазонам длин;
- Обращать внимание на четкость и выраженность пиков;
- При неоднозначных результатах проводить повторное исследование;
- Необходимо оценивать не только наличие пиков, но и их относительную интенсивность;
- Важно учитывать возможные артефакты;
- Следует обращать внимание на симметричность и форму пиков;
- Все полученные данные должны быть зафиксированы: необходимо отметить особенности каждого канала детекции, следует указать наличие или отсутствие MSI для каждого локуса, при необходимости нужно описать особенности морфологии сигналов.

При исследовании опухолей желудочно-кишечного тракта с помощью 5-маркерной панели существует важное диагностическое правило. Если анализ показывает нестабильность только одного или двух маркеров из пяти, это требует особого внимания и дополнительных исследований. Дело в том, что такая ситуация может быть связана с наследственным носительством редких аллельных вариантов у пациента. Для правильной интерпретации полученных результатов необходимо провести дополнительное исследование образца крови или другой

нормальной ткани пациента. Это поможет определить, является ли наблюдаемая нестабильность маркеров признаком патологии или связана с индивидуальными генетическими особенностями человека. В случаях, когда нет возможности получить и исследовать нормальную ткань пациента, рекомендуется использовать альтернативные методы диагностики. К таким методам относятся высокопроизводительное секвенирование (ВПС) и иммуногистохимическое исследование (ИГХ). Эти методы позволяют получить дополнительную информацию о состоянии тканей и подтвердить или опровергнуть первоначальные результаты анализа.

Такой комплексный подход к диагностике позволяет избежать ложноположительных результатов и обеспечить максимально точную интерпретацию данных. При планировании исследования важно заранее учитывать возможность проведения дополнительных тестов и иметь в виду альтернативные методы диагностики. Это особенно актуально при выявлении нестабильности одного или двух маркеров, когда требуется дополнительное подтверждение результатов.

Точность диагностики напрямую зависит от полноты проведенного исследования и учета всех возможных факторов, влияющих на результаты анализа. Поэтому важно не ограничиваться только первичным исследованием, а при необходимости использовать все доступные методы для получения достоверной картины.

В заключении по результатам молекулярно-генетического исследования микросателлитной нестабильности должны быть четко отражены (Приложение №3, №4):

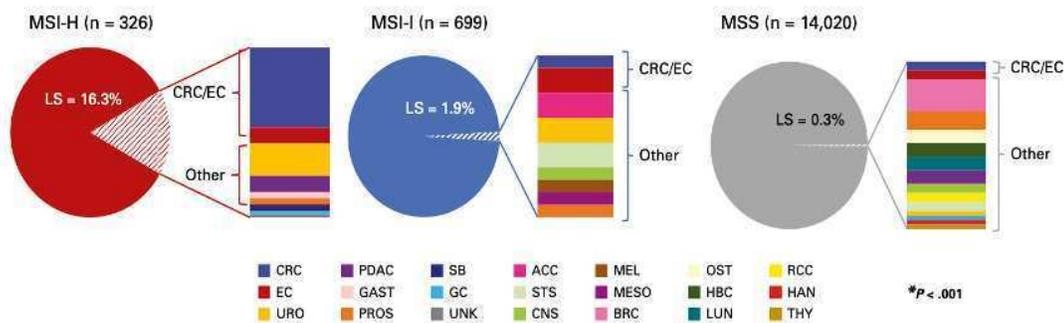
- материалы и методы (с обязательным указанием № исследуемого парафинового блока; название реагентов и прибора);
- общее количество исследованных локусов;
- обнаруженный статус для каждого локуса (MSI или MSS);
- суммарный статус опухоли (MSI или MSS);

Такая детализация позволяет обеспечить прозрачность исследования, предоставить информацию для дальнейшей клинической интерпретации и создать основу для принятия решений о тактике лечения. Важно помнить, что заключение должно быть максимально информативным и содержать все необходимые данные для правильной интерпретации результатов как специалистами, так и клиницистами, принимающими решения о лечении пациента.

3. Использование высокопроизводительного секвенирования для определения микросателлитной нестабильности.

Высокопроизводительное секвенирование все чаще применяется для мультигенного тестирования опухолевой ткани с целью персонализации планируемого лечения. Использование данного метода для определения MSI мотивировано потенциальной возможностью сочетанного анализа молекулярных мишеней для таргетной терапии и статуса большого количества микросателлитных последовательностей, как потенциальных источников формирования неоантигенов, являющихся целью воздействия иммуноонкологической терапии. Именно этот подход, в отличие от других, упомянутых ранее, способен дать наиболее полную информацию о количестве поврежденных микросателлитов в образце опухоли и оценить возможную иммуногенность опухоли. Идеальными методами исследования нестабильных микросателлитов являются анализ полного генома и полного экзома опухоли, поскольку они позволяют определить практически полный спектр маркеров (более 19 000 000 микросателлитных локусов в геноме и более 380 000 в экзоме). Однако известные сложности в трактовке результатов и высокая стоимость данных подходов ограничивают возможность их использования в рутинной практике.

Кроме этого, высокопроизводительное секвенирование может служить дополнительным методом исследования при выявлении несовпадений между результатами ИГХ и ПЦР с фрагментным анализом, особенно при тестировании гетерогенных опухолей матки и редких опухолей с признаками микросателлитной нестабильности. В ряде случаев, особенно при манифестации синдрома Линча нетипичными опухолями, секвенирование является единственным методом, способным определить, является ли данное новообразование с признаками dMMR, носителем достаточного количества нестабильных маркеров, определяющих возможность ответа на иммуноонкологическую терапию. Как показывают исследования, посвященные диагностике синдрома Линча в смешанной популяции больных со злокачественными новообразованиями, инактивация белков системы MMR, вызванная синдромом Линча, сопровождается выраженной микросателлитной нестабильностью только в опухолях с высоким индексом пролиферации. В то время, как опухоли, для которых характерна низкая скорость деления клеток, могут демонстрировать dMMR в отсутствие выраженной MSI, при этом они отличаются низкой мутационной нагрузкой и отсутствием чувствительности к иммунотерапии (см. рис. 15). Применение высокопроизводительного секвенирования позволяет определить так называемую «промежуточную» группу, неоднородно отвечающую на иммунотерапию и до сих пор являющуюся предметом исследования.



MSI – высокая степень микросателлитной нестабильности
 MSE – промежуточная степень микросателлитной нестабильности
 MSS – отсутствие микросателлитной нестабильности

CRC - колоректальный рак
 EC - эндометриодный рак
 URD - уротелиальный рак
 PDAC – аденокарц. поджелудочной железы
 GAST – рак желудка
 PROS – рак простаты
 SB – рак тонкого кишечника

GC – герминальные опухоли
 UINK - неизв первичный очаг
 ACC – аденокарцинома
 STS – саркомы мягкой ткани
 CNS – опухоли ЦНС
 MEL - меланома
 MESO - мезотелиома

BRC – рак молочной железы
 OST - остеосаркома
 HBC – гепатобилиарный рак
 LUN - рак легкого
 RCC – рак почки
 HAN – опухоли головы и шеи
 THY – рак щитовидной железы

Рисунок 15. Распределение гистологических форм опухолей у носителей синдрома Линча с разной степенью микросателлитной недостаточности

Большинство панелей, предназначенных для детекции MSI, основано либо на анализе экзома, либо на использовании коммерческих диагностических решений, содержащих несколько десятков или сотен генов и предназначенных преимущественно для агностического выбора таргетной терапии. Важным является правильный выбор информативных локусов, как правило, содержащих несколько мононуклеотидных повторов (2-3), причем с присутствием наиболее частых популяционных аллелей и с достаточно равномерным покрытием. Также следует помнить, что при использовании ограниченного количества маркеров, может возникнуть проблема ложноотрицательных случаев, связанная с неравномерным распределением нестабильных STR в разных гистологических типах опухолей. Возможным средством оптимизации является разработка специального программного обеспечения, позволяющая наиболее точно анализировать данные секвенирования. Как правило, за пороговую величину принимается выявление более 20% нестабильных микросателлитов из общего числа валидных. Пограничные значения могут нуждаться в подтверждении МСН с помощью оценки мутационной нагрузки.

Обработка данных может подразумевать как сопоставление длин микросателлитов в парных образцах «опухоль-норма», так и анализ «квазимономорфных» (отличающихся высокой степенью стабильности между различными индивидуумами) маркеров. В научной литературе представлено около двух десятков биоинформатических инструментов, позволяющих сделать вывод о присутствии или отсутствии микросателлитной нестабильности на основе результатов данных секвенирования. В последние годы для оценки результатов исследования все чаще используется искусственный интеллект.

Возможность использования валидированных панелей для определения MSI методом высокопроизводительного секвенирования в рамках молекулярно-генетического исследования ряда опухолей включена в большинство международных клинических рекомендаций и упомянута в качестве опции в новой версии национальных рекомендациях по колоректальному раку.

Однако до сих пор существуют определенные сложности, не позволяющие однозначно оценить валидность применения высокопроизводительного секвенирования для оценки микросателлитной нестабильности. В первую очередь, это отсутствие стандартизации подходов, существенные различия в алгоритмах и пороге отсечения, сложности в выборе референсных методик для

разбора случаев несовпадения результатов при использовании разных панелей. Тем не менее, российские производители разработали набор реагентов, проходящий апробацию в лабораториях основных медицинских организаций г.Москвы и некоторых федеральных центров, получивший регистрационное удостоверение Росздравнадзора и используемый в настоящее время для научно-исследовательских целей. После получения окончательных данных по результатам апробации, планируется создать СОП по применению данного набора для диагностических целей и представить его в качестве дополнения к данным методическим рекомендациям.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol.* 2015;47(4):1189–202. doi:10.3892/ijo.2015.3119.
2. Long DR, Waalkes A, Panicker VP, et al. Identifying Optimal Loci for the Molecular Diagnosis of Microsatellite Instability. *Clin Chem.* 2020;66(10):1310–1318. doi:10.1093/clinchem/hvaa177.
3. Nebot-Bral L, Coutzac C, Kannouche PL, et al. Why is immunotherapy effective (or not) in patients with MSI/MMRD tumors? *Bull Cancer.* 2019;106(2):105–113. doi:10.1016/j.bulcan.2018.08.007.
4. Wang C, Zhang L, Vakiani E, et al. Detecting mis-match repair deficiency in solid neoplasms: immuno-histochemistry, microsatellite instability, or both? *ModPathol.* 2022; 35(11):1515–1528. doi:10.1038/s41379-022-01109-4.
5. Josef Rüschoff, Hans-Ulrich Schildhaus, Jan Hendrik Rüschoff, et al. Testing for deficient mismatch repair and microsatellite instability. A focused update. *Pathologie.* 2023; 44 (Suppl 2): S61–S70, <https://doi.org/10.1007/s00292-023-01208-2>.
6. F. Grillo, M. Paudice, A. Gambella, et al. Evaluating mismatch repair deficiency in colorectal cancer biopsy specimens. *Histochemistry and Cell Biology.* 2023; 160:113–125. <https://doi.org/10.1007/s00418-023-02202-8>

7. Gianmaria Miolo, Wally Marus, Angela Buonadonna, et al. Null Mismatch Repair Proteins Expression Reveals the Temporal Molecular Events in Lynch Syndrome-Related Cancers. *Diagnostics*. 2024; 14, 888. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14090888>.
8. Yue M, Liu JY, Liu YP. Unusual immunohistochemical “null” pattern of four mismatch repair proteins in gastric cancer: A case report // *World J Clin Cases*. 2021 Jul 26;9(21):6102–6109. DOI: 10.12998/wjcc.v9.i21.6102. PMID: 34368332. PMCID: PMC8316949.
9. Цуканов А.С., Демидова И.А., Цаур Г.А., Друй А.Е., Ольшанская Ю.В., Кекеева Т.В., Филипенко М.Л., Имянитов Е.Н. Диагностика синдрома Линча у онкологических пациентов: позиция Межрегиональной организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии. *Вопросы онкологии*, 2023. Том 69, No 1, С.7-14. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2023-69-1-7-14>.
10. Демидова И.А., Филипенко М.Л., Цуканов А.С., Имянитов Е.Н. Микросателлитная нестабильность: нюансы лабораторной диагностики (позиция Межрегиональной организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии). *Вопросы онкологии*, 2023. Том 69, No 2, С.174-179. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2023-69-2-174-179>.
11. Сендерович А. И., Горбань Н. А. Микросателлитная нестабильность: методы исследования, преимущества и недостатки. *Онкопатология* 2022;1–2(5):24–30. DOI: 10.17650/2618-7019-2022-5-1-2-24-30.
12. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, et al. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun*, 2017;8:15180. doi:10.1038/ncomms15180.
13. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR Suraweera, Nirosha et al. *Gastroenterology*, Volume 123, Issue 6, 1804 – 1811.
14. Chen ML, Chen JY, Hu J, Chen Q, Yu LX, Liu BR, Qian XP, Yang M. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018 Mar 1;11(3):1431-1438. PMID: 31938240; PMCID: PMC6958115.
15. Spaanderman IT et al. Framing potential of public frameshift peptides as immunotherapy targets in colon cancer *PLoS One* 2021 e0251630. doi: 10.1371/journal.pone.0251630.
16. Shia J. The diversity of tumours with microsatellite instability: molecular mechanisms and impact upon microsatellite instability testing and mismatch repair protein immunohistochemistry. *Histopathology*. 2021 Mar;78(4):485-497. doi: 10.1111/his.14271. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33010064.

17. Latham A, et al. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. J Clin Oncol. 2019 Feb 1;37(4):286-295. doi: 10.1200/JCO.18.00283. Epub 2018 Oct 30. Erratum in: J Clin Oncol. 2019 Apr 10;37(11):942. PMID: 30376427; PMCID: PMC6553803.
18. Hempelmann J.A. et al. MSIplus for Integrated Colorectal Cancer Molecular Testing by Next-Generation Sequencing J Mol Diagn. 2015 Nov;17(6):705-14. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.05.008.
19. Jia P et al. MSIsensor-pro: Fast, Accurate, and Matched-normal-sample-free Detection of Microsatellite Instability. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2020 Feb;18(1):65-71. doi: 10.1016/j.gpb.2020.02.001.
20. Swaerts, K., Dedeurwaerdere, F., De Smet, D. и др. DeltaMSI: моделирование оценки микросателлитной нестабильности на основе искусственного интеллекта на основе данных секвенирования следующего поколения. ВПС Bioinformatics 24, 73 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05186-3>.
21. NCCN Guidelines Version 2.2025 Colon Cancer.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1: Пример протокола иммуногистохимического исследования биопсийного (операционного) материала: статус опухоли – dMMR.

НАИМЕНОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Адрес медицинской организации

ОМС

Медицинская документация,
учётная форма 014-1у

ПРОТОКОЛ

иммуногистохимического исследования биопсийного (операционного) материала

Регистрационный
номер:

124000000

Дата и время проведения
исследования:

00.00.2025 00:00

СВЕДЕНИЯ О ПАЦИЕНТЕ :

№ полиса ОМС:

5055000000000000

СНИЛС

000-000-000 00

Фамилия Имя Отчество:

Xxxxx Xxxx Xxxxxxx

Пол:

Женский

Дата рождения:

00.00.1900 (Возраст: 00 лет)

Место регистрации:

Москва г., г. Зеленоград, , корп.000, кв.00

Местность:

№ медицинской
карты:

Приложение №2: Пример протокола иммуногистохимического исследования биопсийного (операционного) материала: статус опухоли – pMMR.

НАИМЕНОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Адрес медицинской организации

ОМС

Медицинская документация,
учётная форма 014-1у

ПРОТОКОЛ

иммуногистохимического исследования биопсийного (операционного) материала

Регистрационный номер: **124000000** Дата и время проведения исследования: **00.00.2025 00:00**

СВЕДЕНИЯ О ПАЦИЕНТЕ :

№ полиса ОМС: **7740000000000000** СНИЛС: **000-000-000 00**
Фамилия Имя Отчество: **Ххххххх Ххххххх Ххххххххххх**
Дата рождения: **00.00.1900 (Возраст: 00 года)** Пол: **Женский**
Место регистрации: **Москва г., СЗАО, ххх, ххх., д.0, корп.0, кв.000**
Местность: **Городская** № медицинской карты: **0000000-2020-А**

ДАННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ: Регистрационный номер направления: **000000000000**

Медицинская организация: **Эндоскопическое отделение**
Врач, направивший материал: **Ххххх Ххх Ххххххх, должность: Врач-эндоскопист**
Диагноз направления: **С16.0: Злокачественное новообразование кардии**
Клинические сведения: **Ст желудка с распространением на нижнюю треть пищевода.**
Задача прижизненного патолого-анатомического исследования: **ИНС_НnE, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2**

МАТЕРИАЛЫ:

Дата поступления биоматериала: **00.00.2025** Время: **00:00:00**
Дата и время регистрации материала: **00.00.2025 00:00:00**

Назначенные окраски: **ИНС_НnE, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2**
Номера гистологических блоков: **B230000100-1-2;**

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ:

Контейнер 51300000000_00:

Три кусочка ткани диаметром по 0,2 см (1.1)
Три кусочка ткани диаметром по 0,2 см (1.2)
Два кусочка ткани диаметром по 0,2 см (1.3)

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ:

В контрольном срезе, окрашенном гематоксилином и эозином фрагмент слизистой оболочки желудка с ростом опухоли.

Контроль качества реакции:

Во внешнем позитивном контроле (в эпителиальных, лимфоидных и стромальных клетках фрагмента толстой кишки), смонтированном на том же стекле, что и исследуемая опухолевая ткань, выявлена ядерная реакция различной степени выраженности всех исследованных маркёров. Во внутреннем позитивном контроле (в клетках стромы опухоли) выявлена ядерная реакция различной степени выраженности всех исследованных маркёров.

Результат исследования опухолевой ткани, выполненного на иммуноштейнере Ventana ULTRA:

MLH1 (M1): диффузная различной степени выраженности ядерная реакция в опухолевых клетках.

PMS2 (A16-4): диффузная различной степени выраженности ядерная реакция в опухолевых клетках.

MSH2 (G219 1129): диффузная различной степени выраженности ядерная реакция в опухолевых клетках.
 MSH6 (SP93): диффузная различной степени выраженности ядерная реакция в опухолевых клетках.

РЕЗУЛЬТАТ ИГХ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Иммуногистохимические признаки дефицита ферментов репарации неспаренных оснований в опухоли не обнаружены (статус опухоли – pMMR).

Комментарий: в опухоли обнаружены нормальные уровни экспрессии белков репарации ДНК (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), что с большой долей вероятности исключает синдром Линча и спорадическую микросателлитную нестабильность.

Категория сложности: Категория 5 Требуется провести МГИ Нет
 Код по МКБ-10: C16.0
 Топографический код по МКБ-О: C16.0
 Морфологический код по МКБ-О: 8000/3: Злокачественная опухоль (син.)

Медицинские услуги:

Код: 029007 Иммуногистохимическое исследование одного тканевого фрагмента биопсийного (операционного и диагностического) материала с постановкой одной иммунологич Количество: 4

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫПОЛНЯЛИ:

Врач-патологоанатом: Ххххх Ххх Ххххххх _____ врач-патологоанатом
 Фельдшер-Лаборант: Ххххх Ххх Ххххххххх _____ медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант)

Приложение №3: Пример протокола молекулярно-генетического исследования: опухоль имеет стабильный фенотип (MSS).

НАИМЕНОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Адрес медицинской организации

ПРОТОКОЛ

**молекулярно-генетического исследования
 № 0000/00**

Фамилия имя отчество: Иванов Иван Иванович

Пол: мужской

Дата рождения: 01.01.1950

Вид оплаты:

Полис ОМС: 0000000000000000

Диагноз основного заболевания: C19.0

Наименование медицинской организации, направившей материал: XXXXXXXXXXXXXXXX

Дата забора биологического материала: 00.00.0000

Дата поступления в лабораторию биологического материала: 00.00.0000

Биологический материал:

1) парафиновый блок № 0000-0/00;

Опухолевой ткани в исследуемом образце по результатам заключения ПАО составил: XX %

Проводилась микродиссекция: да/нет

2) Нормальная ткань исследовалась: да/нет

Вид исследования: Определение микросателлитной нестабильности (MSI)

Метод исследования: (Пример) Набор реагентов для ПЦР-диагностики микросателлитной нестабильности генома человека с детекцией результата методом капиллярного электрофореза «COrDIS MSI» РУ № РЗН 2020/10836 от 17.06.2020 г., на приборе Applied Biosystems 3500 РУ № ФСЗ 2010/07007 от 14.10.2016

Результат исследования:

| Параметр | Результат опухолевая ткань | Результат нормальная ткань |
|---------------|----------------------------|----------------------------|
| маркер BAT-25 | MSS | MSS |
| маркер BAT-26 | MSS | MSS |
| маркер NR-21 | MSS | MSS |
| маркер NR-24 | MSS | MSS |

| | | |
|--|------------|------------|
| маркер NR-27 | MSS | MSS |
| Микросателлитный статус опухоли | MSS | MSS |

Заключение:

Выполнено молекулярно-генетическое исследование - анализ микросателлитной нестабильности (маркеры BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 и NR-27).

При исследовании ДНК, выделенной из фиксированной формалином и залитой в парафин опухолевой ткани, аллельных вариаций исследуемых локусов не обнаружено. Опухоль имеет стабильный фенотип (MSS).

При исследовании ДНК, выделенной из нормальной ткани (периферическая кровь), аллельных вариаций исследуемых локусов не обнаружено.

Исследование выполняли:

Врач-лабораторный генетик

(Ф.И.О.)

Заведующий лабораторией

(Ф.И.О.)

Дата: 00.00.0000

Приложение №4: Пример протокола молекулярно-генетического исследования: опухоль имеет фенотип микросателлитной нестабильности (MSI).

НАИМЕНОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Адрес медицинской организации

ПРОТОКОЛ

молекулярно-генетического исследования

№ 0000/00

Фамилия имя отчество: Иванов Иван Иванович

Пол: мужской

Дата рождения: 01.01.1950

Вид оплаты:

Полис ОМС: 0000000000000000

Диагноз основного заболевания: C19.0

Наименование медицинской организации, направившей материал: XXXXXXXXXXXXXXXX

Дата забора биологического материала: 00.00.0000

Дата поступления в лабораторию биологического материала: 00.00.0000

Биологический материал:

1) парафиновый блок № 0000-0/00;

Опухолевой ткани в исследуемом образце по результатам заключения ПАО составил: XX %

Проводилась микродиссекция: да/нет

2) Нормальная ткань исследовалась: да/нет

Вид исследования: Определение микросателлитной нестабильности (MSI)

Метод исследования: (Пример) Набор реагентов для ПЦР-диагностики микросателлитной нестабильности генома человека с детекцией результата методом капиллярного электрофореза «COгDIS MSI» РУ № РЗН 2020/10836 от 17.06.2020 г., на приборе Applied Biosystems 3500 РУ № ФСЗ 2010/07007 от 14.10.2016

Результат исследования:

| Параметр | Результат опухолевая ткань | Результат нормальная ткань |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| маркер BAT-25 | MSI | MSS |
| маркер BAT-26 | MSI | MSS |
| маркер NR-21 | MSI | MSS |

| | | |
|--|------------|------------|
| маркер NR-24 | MSI | MSS |
| маркер NR-27 | MSI | MSS |
| Микросателлитный статус опухоли | MSI | MSS |

Заключение:

Выполнено молекулярно-генетическое исследование - анализ микросателлитной нестабильности (маркеры BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 и NR-27).

При исследовании ДНК, выделенной из фиксированной формалином и залитой в парафин опухолевой ткани, выявлена микросателлитная нестабильность по локусам BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-27 и NR-24. Опухоль имеет фенотип микросателлитной нестабильности (MSI).

При исследовании ДНК, выделенной из нормальной ткани (периферическая кровь), аллельных вариаций исследуемых локусов не обнаружено.

Исследование выполняли:

Врач-лабораторный генетик

(Ф.И.О.)

Заведующий лабораторией

(Ф.И.О.)

Дата: 00.00.0000

Приложение №5. Разбор случаев некачественных заключений.

Случай №1.

атипии.
 В препаратах ИГХ-исследования с антителами MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS2.
 MLH-1 - положительная ядерная реакция в 5% опухолевых клетках
 MSH-2 - положительная ядерная реакция в 50% опухолевых клетках
 MSH-6 - положительная ядерная реакция в 100% опухолевых клетках
 PMS2 - положительная ядерная реакция в 10% опухолевых клетках
 Выявлены признаки микросателлитной нестабильности MSI-H.
 При сравнении - опухоли имеют одинаковое строение.

Разбор: Тест на dMMR является качественным и когда он проведен правильно в заключении говорят либо об утрате экспрессии конкретного белка (или пары белков), либо о наличии экспрессии всех белков. Пороговых значений ядерной реакции для оценки уровня экспрессии белков системы MMR не существует. Поэтому никаких процентов указывать в заключении нельзя! Аббревиатура MSI-H в настоящее время не используется.

Случай №2.

| Исследование | Результат | Комментарий |
|---|-------------|--|
| Определение мутаций в 15 экзоне гена BRAF | обнаруж. | Мутации V600E в гене BRAF обнаружено |
| Определение мутаций во 2, 3, 4 экзоне гена KRAS | не обнаруж. | Обнаружена мутация G12A в гене KRAS |
| Определение мутаций во 2, 3, 4 экзоне гена NRAS | обнаруж. | Патогенных aberrаций в кодонах 12, 13, 61, 117 гена NRAS не обнаружено |
| Определение микросателлитной нестабильности (MSI) | обнаруж. | Микросателлитной нестабильности (MSI) обнаружено |

Разбор: В данном случае у пациента 34 лет имелось 2 синхронные опухоли толстой кишки. При этом в представленном заключении нет указания ни на количество исследованных образцов, ни на используемые методы. Более того, часть результатов и комментариев к ним явно противоречат друг другу (обнаружено - не обнаружено). Было проведено повторное изучение 2 образцов опухоли в молекулярно-генетической лаборатории федерального Центра. В результате обе опухоли имели фенотип MSS. **Грубейшие ошибки!**

Случай №3.

Заключение

в исследуемом образце:

| | | |
|---------------|--|----------------------|
| не обнаружена | мутация в гене KRAS | <input type="text"/> |
| не обнаружена | мутация в гене NRAS | <input type="text"/> |
| не обнаружена | мутация в гене BRAF | <input type="text"/> |
| не обнаружена | микросателлитная нестабильность (MSI). | <input type="text"/> |

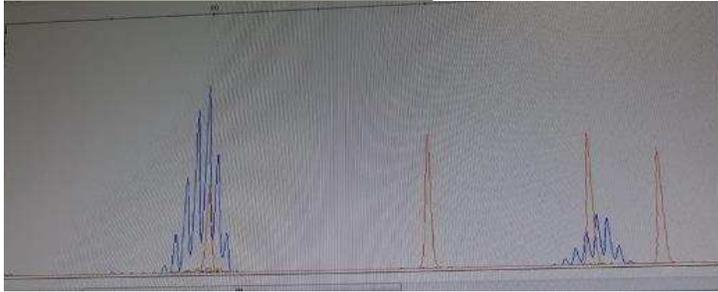
Примечание: в предоставленном материале ~1% опухолевых клеток.

Разбор: Как уже говорилось выше: “Если в образце менее 50 % опухолевых клеток, то необходимо проводить макро- или микродиссекцию для увеличения содержания опухолевых клеток в образце (разметку препарата с обратной стороны предметного стекла, отметив границы зоны опухоли). При отсутствии возможности проведения диссекции следует отказаться от проведения исследования молекулярно-генетическим методом”.

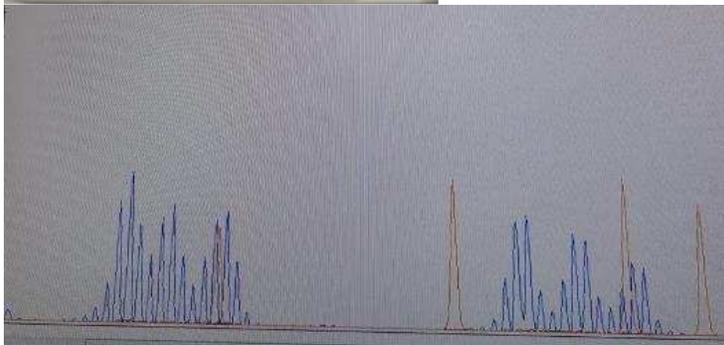
Таким образом, результат данного заключения об отсутствии микросателлитной нестабильности не является валидным и требуется повторный анализ образца.

Случай №4.

Данные тестирования МСН «Когда клеток опухоли мало»

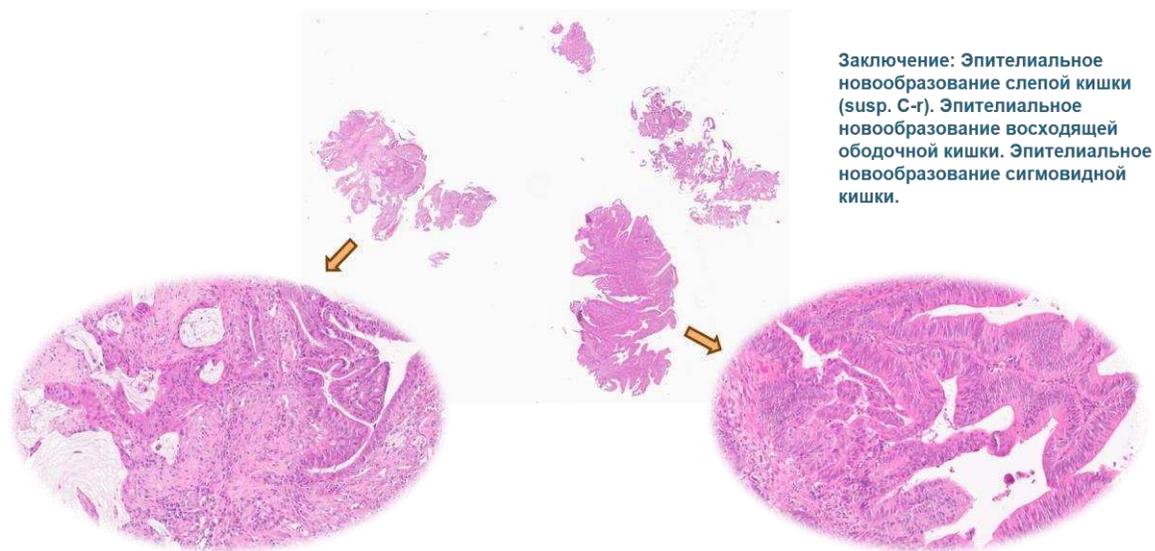


Данные тестирования МСН «Когда клеток опухоли больше 50%»

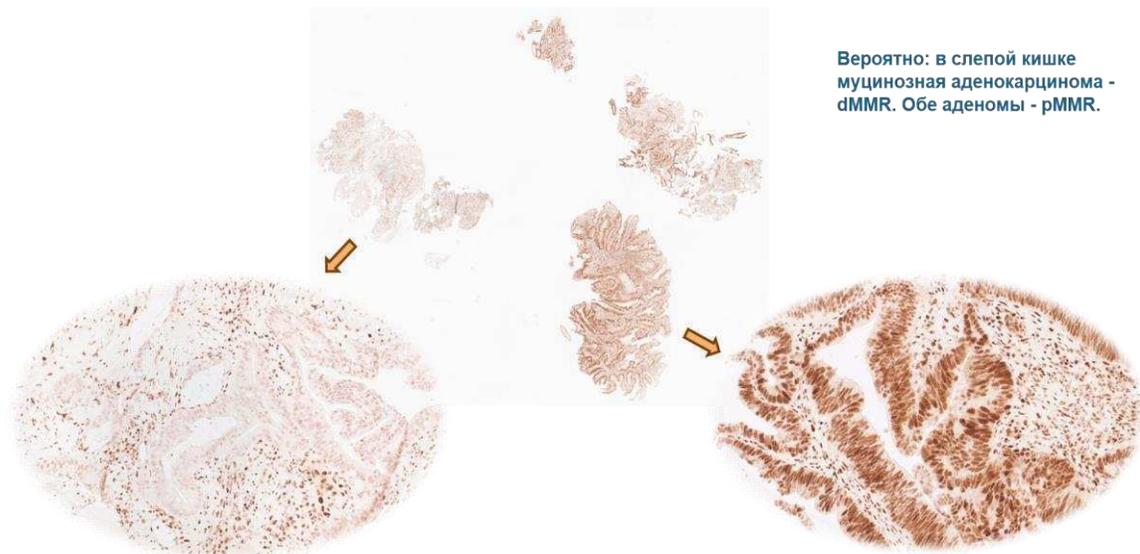


Разбор: В данном случае различаются результаты исследования статуса МСН одного и того же биопсийного образца пациента в случаях после проведения диссекции и при ее отсутствии. Соответственно, в случае когда клеток опухоли мало получен ложноотрицательный результат - MSS, хотя на самом деле опухоль имеет фенотип MSI!

Случай №5.



Заключение: Эпителиальное новообразование слепой кишки (susp. С-г). Эпителиальное новообразование восходящей ободочной кишки. Эпителиальное новообразование сигмовидной кишки.



Вероятно: в слепой кишке муцинозная аденокарцинома - dMMR. Обе аденомы - pMMR.

Разбор: У пациента выполнена биопсия трёх опухолей толстой кишки. Фрагменты всех трёх опухолей помещены в один флакон с формалином. Две опухоли имеют строение аденомы и статус pMMR, а одна опухоль имеет строение аденокарциномы и статус dMMR (выпадение пары MLH1/PMS2). Определить локализацию аденокарциномы при помещении всех биоптатов в один флакон возможно лишь по косвенным признакам - по описанию, данному эндоскопистом!