

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 В ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Г.А. Раскин^{1,2}, С.В. Петров³, Р.В. Орлова^{1,2}

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, г. Санкт-Петербург¹

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург²

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань³

197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70, e-mail: rasking@list.ru

Аннотация

Микросателлитная нестабильность связана с нарушением функций генов MSH2, MLH1, PMS2 и MSH6, которые в норме осуществляют репарацию неспаренных нуклеотидов ДНК. В настоящее время известно, что микросателлитная нестабильность – это независимый прогностический фактор, определяющий степень злокачественности рака толстой кишки. Использование иммуногистохимии для исследования системы репарации неспаренных нуклеотидов имеет свои особенности и ограничения. **Материал и методы.** В исследование вошло 39 больных аденокарциномой толстой кишки из них умереннодифференцированная аденокарцинома – 28 (72 %), высокодифференцированная аденокарцинома – 3 (8 %), низкодифференцированная аденокарцинома – 5 (12 %), муцинозная аденокарцинома – 3 (8 %) случая. Иммуногистохимически по стандартному протоколу исследовались белки генов MSH2, MSH6, PMS2, MLH1. **Результаты.** Из 39 исследованных случаев в 6 (15 %) наблюдениях было выявлено выпадение экспрессии как минимум одного из исследованных маркеров. Из 6 полученных случаев с косвенными признаками MSI-H три аденокарциномы были низкодифференцированными, 1 – муцинозной, 2 – умереннодифференцированными. **Заключение.** Иммуногистохимическое исследование генов репарации ДНК может быть использовано для определения степени злокачественности аденокарциномы толстой кишки совместно с оценкой гистологической дифференцировки опухоли. При использовании только гистологической дифференцировки для определения степени злокачественности аденокарциномы толстой кишки в 10 % случаев она будет оценена неверно.

Ключевые слова: микросателлитная нестабильность, аденокарцинома толстой кишки, MSH2, MSH6, PMS2, MLH1.

Использование иммуногистохимических методов для исследования системы репарации неспаренных нуклеотидов имеет свои особенности и ограничения. В основном мутация MMR-генов сопровождается деградацией соответствующего белка и отрицательной иммуногистохимической реакцией. Иммуногистохимия, однако, не способна дифференцировать белок с миссенс-мутацией от дикого типа белка. Около 30 % случаев мутаций в MLH1 носят миссенс-характер, которые приводят к потере его функции, но сохраняют антигенные свойства [9]. Однако MMR-протеины функционируют в виде гетеродимеров [4]. MSH2 димеризуется с MSH6, образуя функциональный комплекс MutSα38, а MLH1 димеризуется с PMS2, формируя MutLα [3]. MLH1 – облигатный партнер PMS2, соответственно, нарушение структуры MLH1 приводит к разрушению димера и потере экспрессии второго белка. Однако мутации PMS2 и MSH6 не обязательно приводят к деградации их партнеров, потому что MLH1 и MSH2 могут альтернативно связываться с MSH3, MLH3 и PMS1. Тем не менее

иммуногистохимическое исследование PMS2 позволяет выявлять миссенс-мутации MLH1, даже в условиях его антигенной сохранности [10]. Мутации же данных генов во всех исследованных случаях сопровождаются выпадением экспрессии исследованных генов, но не наоборот. Это связано с тем, что в ряде случаев негативная иммуногистохимическая реакция является отражением гиперметилирования исследованного гена.

Микросателлитная нестабильность связана с нарушением функций генов MSH2, MLH1, PMS2 и MSH6, которые в норме осуществляют репарацию неспаренных нуклеотидов ДНК [5–7]. В наших предыдущих исследованиях во всех случаях с негативной реакцией хотя бы на один из исследованных маркеров (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) наблюдалась микросателлитная нестабильность [1]. В настоящее время известно, что микросателлитная нестабильность – это независимый прогностический фактор, определяющий степень злокачественности рака толстой кишки [2].

Таблица 1

Характеристика антител к белкам генов репарации неспаренных нуклеотидов ДНК

Антитело	Характеристика	Разведение	Фирма-производитель
MSH6	Кроличье, клон EPR3945	1:200	Abcam
MSH2	Мышиное, клон 25D12	1:20	DBS
PMS2	Мышиное, клон MOR4G	1:40	Novocastra Leica
MLH1	Мышиное, клон ES05	1:25	Novocastra Leica

Материал и методы

В исследование вошли 39 больных аденокарциномой толстой кишки, из них 26 женщин и 13 мужчин. Средний возраст составил 59 лет. Распределение по гистологической дифференцировке: умереннодифференцированная аденокарцинома – 28 (72 %), высокодифференцированная аденокарцинома – 3 (8 %), низкодифференцированная аденокарцинома – 5 (12 %), муцинозная аденокарцинома – 3 (8 %) случая.

Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартному протоколу: срезы с парафиновых блоков наносились на поли-L-лизиновые стекла с последующей инкубацией их при температуре 35–37°C в условиях термостата с целью плотного их прикрепления. Затем выполнялась депарафинизация материала в ксилоле, отмывка в 96 % и 70 % этиловых спиртах, дистиллированной воде. После этого проводилась демаскировка антигенов при температуре 96°C в буфере Antigen Retrieval Solution (DAKO), pH 9,0. Последовательно выполнялись ингибирование эндогенной пероксидазы 3 % перекисью водорода, инкубация первых антител к MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 (табл. 1); выявление комплекса антиген – антитело осуществлялось при помощи системы визуализации DakoEnVision и диаминобензидина в качестве хромогена.

Окрашивание ядер осуществлялось при помощи гематоксилина Майера (инкубация была уменьшена в сравнении со стандартным протоколом). Оценивалась только ядерная реакция. Внутренним контролем была нормальная слизистая оболочка, прилежащая к аденокарциноме. Экспрессия считалась утраченной в случае, если более 50 % раковых клеток демонстрировали негативную реакцию. Отдельно отмечались случаи со сниженной экспрессией (менее 90 % клеток с позитивной реакцией).

Результаты исследования и обсуждение

Из 39 исследованных случаев в 6 (15 %) наблюдениях было выявлено выпадение экспрессии как минимум одного из исследованных маркеров (MSH2, MSH6, PMS2, MLH1) (рис. 1). В 4 случаях наблюдалась отрицательная иммуногистохимическая реакция на MLH1 и PMS2, а в 2 наблюдениях – на MSH6 и MSH2. Данный результат показывает, что 15 % изученных аденокарцином толстой кишки можно считать сцепленными с микросателлитной

нестабильностью высокой степени (MSI-H). По данным N.M. Lindor et al. [8], при проведении исследования MSI и MMR с использованием иммуногистохимии и ПЦР потеря экспрессии MSH2 и MLH1 в 100 % случаев сопровождается микросателлитной нестабильностью высокой степени. В наших предыдущих исследованиях мы получили аналогичные результаты [1]. Это особенно важно, потому что, согласно современной классификации ВОЗ, считается, что аденокарцинома толстой кишки с MSI-H имеет низкую степень злокачественности, независимо от ее гистологической дифференцировки [2]. В наших наблюдениях из 6

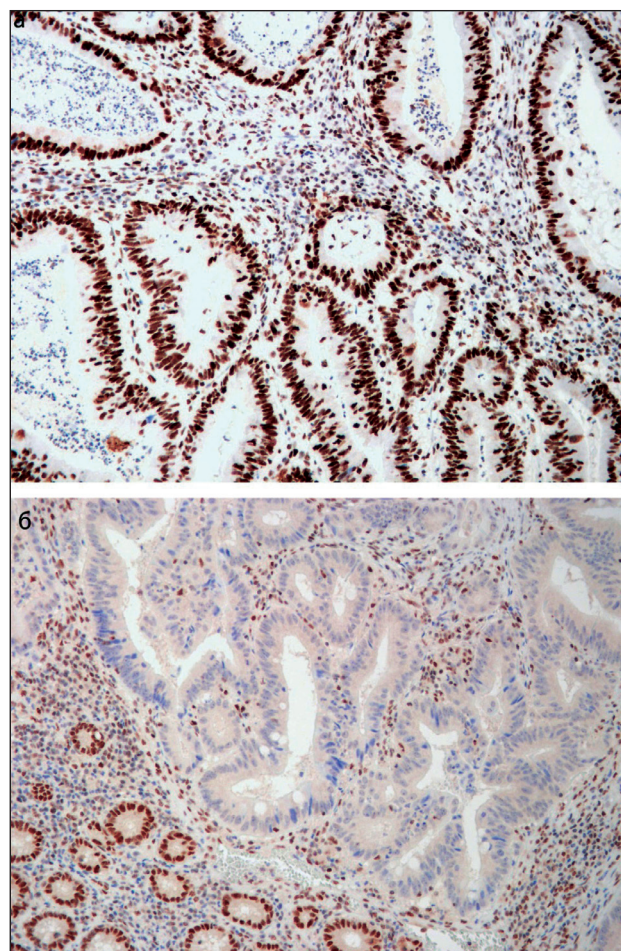


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование MSH6, MLH1 в аденокарциноме толстой кишки: а) интенсивная ядерная реакция на MSH6 в клетках аденокарциномы; б) выпадение экспрессии MLH1 в аденокарциноме (верхняя часть фотографии) в сравнении с сохранной ядерной реакцией в нормальной слизистой оболочке (нижняя часть снимка). ×200

Таблица 2

Распределение изученных случаев аденокарциномы толстой кишки по степени злокачественности в зависимости от использования критерия микросателлитной нестабильности

Вид аденокарцином толстой кишки	Определение степени злокачественности без учета MSI (только гистологическая дифференцировка)	Определение степени злокачественности с учетом MSI
Низкой степени злокачественности (lowgrade)	31 (79 %)	35 (90 %)
Высокой степени злокачественности (highgrade)	8 (21 %)	4 (10 %)

случаев с косвенными признаками MSI-H 3 аденокарциномы были низкодифференцированными, 1 – муцинозной, 2 – умереннодифференцированными. Таким образом, без учета MSI четыре (10 %) случая из 39 были бы ложно расценены как опухоли высокой степени злокачественности (табл. 2).

Заключение

Иммуногистохимическое исследование генов репарации ДНК совместно с оценкой гистологической дифференцировки опухоли может быть использовано для определения степени злокачественности аденокарциномы толстой кишки. Если использовать для определения степени злокачественности данной опухоли только гистологическую дифференцировку, то в 10 % случаев она будет оценена неверно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Раскин Г.А., Янус Г.А., Корнилов А.В., Орлова Р.В., Петров С.В., Протасова А.Э., Пожарисский К.М., Имяитов Е.Н. Иммуногистохимическое исследование MSH2, PMS2, MLH1, MSH6 в сопоставлении с анализом микросателлитной нестабильности в аденокарциноме толстой кишки // Вопросы онкологии. 2014. Т. 60, № 2. С. 47–50.
2. Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D. WHO classification of tumors the digestive system. Lyon: IARC Press, 2010. 417 p.
3. Harfe B.D., Minesinger B.K., Jinks-Robertson S. Discrete in vivo roles for the MutL homologs Mlh2p and Mlh3p in the removal of frameshift intermediates in budding yeast // Curr. Biol. 2000. Vol. 10 (3). P. 145–148.
4. Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair // Cell. 2006. Vol. 126 (2). P. 297–308.
5. Kamat N., Khidhir M.A., Alashari M.M., Rannug U. Microsatellite instability and loss of heterozygosity detected in middle-aged patients with sporadic colon cancer: A retrospective study // Oncol. Lett. 2013. Vol. 6 (5). P. 1413–1420.

6. Kheirleiseid E.A., Miller N., Chang K.H., Curran C., Hennessey E., Sheehan M., Kerin M.J. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer // J. Gastrointest. Oncol. 2013. Vol. 4. P. 397–408. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2013.021.
7. Kinzler K.W., Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer // Cell. 1996. Vol. 87 (2). P. 159–170.
8. Lindor N.M., Burgart L.J., Leontovich O., Goldberg R.M., Cunningham J.M., Sargent D.J., Walsh-Vockley C., Petersen G.M., Walsh M.D., Leggett B.A., Young J.P., Barker M.A., Jass J.R., Hopper J., Gallinger S., Bapat B., Redston M., Thibodeau S.N. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors // J. Clin. Oncol. 2002. Vol. 20 (4). P. 1043–1048.
9. Peltomaki P., Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC/INSIGHT mutation database // Dis. Markers. 2004. Vol. 20 (4–5). P. 269–276.
10. Shia J. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. Part I. The Utility of Immunohistochemistry // J. Mol. Diagn. 2008. Vol. 10 (4). P. 293–300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.

Поступила 13.03.15

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Раскин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург, п. Песочный), Российская Федерация. E-mail: rasking@list.ru. SPIN-код: 4569-9756

Петров Семен Венедиктович, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологии, Казанский государственный медицинский университет (г. Казань), Российская Федерация. SPIN-код: 3237-4735

Орлова Рашида Вахидовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой онкологии, медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный университет (г. Санкт-Петербург), Российская Федерация. SPIN-код: 9932-6170

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 IN EVALUATION OF DIFFERENTIATION GRADE OF COLON ADENOCARCINOMA

G.A. Raskin^{1,2}, S.V. Petrov³, R.V. Orlova^{1,2}

Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg¹

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg²

Kazan State Medical University, Kazan³

70, Leningradskaya Street, Pesochny, 197758-Saint Petersburg, Russia, e-mail: rasking@list.ru

Abstract

Microsatellite instability is associated with dysfunction of the MSH2, MLH1, PMS2 and MSH6 genes, which participate in the repair of unpaired nucleotides of DNA. It is known that microsatellite instability is an independent prognostic factor in determining the differentiation grade of colon cancer. The use of immunohistochemistry to study the repair system of unpaired nucleotides has its own characteristics and limitations. **Materials and methods.** The study included 39 patients with colon adenocarcinoma. Moderately-differentiated colon adenocarcinoma was the most common histological type (72 %). There were 8 % of well-differentiated and 12 % poorly-differentiated carcinomas. Immunohistochemical analysis of SH2, MSH6, PMS2 and MLH1 proteins was done according to the standard protocol. **Results.** Out of 39 cases, 6 (15 %) had loss of expression of at least one of the studied proteins. Out of these 6 cases with indirect signs of MSI-H, 3 were poorly-differentiated, 1 was mucinous and 2 were moderately differentiated adenocarcinomas. **Conclusion.** Thus, immunohistochemical analysis of DNA repair genes can be used to determine the histological differentiation of colon adenocarcinoma.

Key words: microsatellite instability, colon adenocarcinoma, MSH2, MSH6, PMS2, MLH1.

REFERENCES

1. Raskin G.A., Janus G.A., Kornilov A.V., Orlova R.V., Petrov S.V., Protasova A.Je., Pozharisskij K.M., Imjanitov E.N. Immunohistochemistry of MSH2, PMS2, MLH1, MSH6 versus microsatellite instability in colon adenocarcinoma // *Voprosy onkologii*. 2014. Vol. 60 (2). P. 47–50. [in Russian]
2. Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D. WHO classification of tumors the digestive system. Lyon: IARC Press, 2010. 417 p.
3. Harfe B.D., Minesinger B.K., Jinks-Robertson S. Discrete in vivo roles for the MutL homologs Mlh2p and Mlh3p in the removal of frameshift intermediates in budding yeast // *Curr. Biol.* 2000. Vol. 10 (3). P. 145–148.
4. Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair // *Cell*. 2006. Vol. 126 (2). P. 297–308.
5. Kamat N., Khidhir M.A., Alashari M.M., Rannug U. Microsatellite instability and loss of heterozygosity detected in middle-aged patients with sporadic colon cancer: A retrospective study // *Oncol. Lett.* 2013. Vol. 6 (5). P. 1413–1420.
6. Kheirleisid E.A., Miller N., Chang K.H., Curran C., Hennessey E., Sheehan M., Kerin M.J. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer // *J. Gastrointest. Oncol.* 2013. Vol. 4. P. 397–408. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2013.021.
7. Kinzler K.W., Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer // *Cell*. 1996. Vol. 87 (2). P. 159–170.
8. Lindor N.M., Burgart L.J., Leontovich O., Goldberg R.M., Cunningham J.M., Sargent D.J., Walsh-Vockley C., Petersen G.M., Walsh M.D., Leggett B.A., Young J.P., Barker M.A., Jass J.R., Hopper J., Gallinger S., Bapat B., Redston M., Thibodeau S.N. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors // *J. Clin. Oncol.* 2002. Vol. 20 (4). P. 1043–1048.
9. Peltomaki P., Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database // *Dis. Markers*. 2004. Vol. 20 (4–5). P. 269–276.
10. Shia J. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. Part I. The Utility of Immunohistochemistry // *J. Mol. Diagn.* 2008. Vol. 10 (4). P. 293–300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.

ABOUT THE AUTHORS

Raskin Grigory Alexandrovich, MD, PhD, Leading Researcher, Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies (Saint Petersburg), Russian Federation. E-mail: rasking@list.ru. SPIN-code: 4569-9756

Petrov Semyen Venediktovich, MD, Professor, Pathology Department, Kazan State Medical University (Kazan), Russian Federation. SPIN-код: 3237-4735

Orlova Rashida Vakhidovna, MD, Professor, Head of Oncology Department, Medical Faculty, Saint Petersburg State University (Saint Petersburg), Russian Federation. SPIN-code: 9932-6170