

A mikroszatellita-instabilitás/mismatch repair deficiencia genetikai hibák molekuláris epidemiológiája intézetünkben: módszertani megfontolások

NÁDORVÁRI MAJA LILLA, KISS ANDRÁS, BARBAI TAMÁS, KULKA JANINA, RÁSÓ ERZSÉBET, TÍMÁR JÓZSEF

Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, Budapest

Levelezési cím:

Dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93., e-mail: timar.jozsef@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2023. április 22.

Elfogadva:

2023. május 4.

Az immunonkológiai kezelések megjelenése a különféle daganatokban, illetve a mikroszatellita-instabilitás (MSI) és mismatch repair deficiencia (dMMR) tumoragnosztikus pozitív prediktív markerként történő használata egyre nagyobb számú ilyen vizsgálat elvégzését hozta magával, így lehetőség nyílt arra, hogy ezen génhibák gyakoriságát megállapítsuk a különféle daganatokban intézetünk anyagában. Vastagbél- és gyomorrákok esetében a nemzetközi incidenciához közeli adatokat kapunk, és nálunk is leggyakoribbak a méhestrákokban. Feltűnt azonban, hogy az immunhisztokémiai módszerrel történő dMMR-meghatározás a mikroszatellita-instabilitás PCR-módszerrel elvégzett meghatározásához képest magasabb arányokat jelez. A nagyszámú, párhuzamosan végzett vizsgálat elemzése azt mutatta, hogy a mikroszatellita-instabilitás immunhisztokémiai alapú predikciója viszonylag alacsony gyakorisággal igazolódik PCR-módszerrel végzett vizsgálatokkal, ezért a terápiás döntések súlyának figyelembevételével javaslatot teszünk arra, hogy az ún. négymarkeres immunhisztokémiai gyanú esetén az ötmarkeres PCR-vizsgálat is elkészüljön. *Magy Onkol 67:147-153, 2023*

Kulcsszavak: mismatch repair deficiencia, mikroszatellita-instabilitás, rosszindulatú daganat, PCR, immunhisztokémia

Molecular epidemiology of mismatch repair deficiency (dMMR)/microsatellite instability (MSI) are different in various ethnic groups; accordingly, our aim was to test this in a large single-center Hungarian cancer patient cohort. We have found that dMMR/MSI incidence correlates well with TCGA data in case of colorectal, gastric and endometrial cancers. We have also observed that immunohistochemistry-based dMMR incidences are higher as compared to MSI. We suggest that the testing guidelines must be fine-tuned for immune-oncology indications. Nádorvári ML, Kiss A, Barbai T, Rásó E, Tímár J. Molecular epidemiology of mismatch repair deficiency, microsatellite instability in a large single diagnostic center cancer cohort.

Nádorvári ML, Kiss A, Barbai T, Kulka J, Rásó E, Tímár J. Molecular epidemiology of microsatellite instability/mismatch repair deficiency in our institute – methodical aspects. Magy Onkol 67:147-153, 2023

Keywords: mismatch repair deficiency, immunohistochemistry, microsatellite instability, PCR, malignant tumors

BEVEZETÉS

A DNS-ben keletkező genetikai hibákat öt nagy, ún. hibajavító rendszer korrigálja: a kettősszálú töréseket javító homológ rekombinációs hibajavító (HRR), a nem homológ végkapcsolást javító NHEJ, az egyszálú töréseket, illetve egybázisú mutációkat javító BER, az összetett keresztkötéseket korrigáló nukleotidkivágó javítás, a NER, és az össze nem illő párok javítását végző MMR. Ezek hibás vagy nem megfelelő működésének eredménye a rosszindulatú daganatokban felhalmozódó genomszintű mutációtömeg, a tumormutációs terhelés (TMB) [1].

Az emberi genomban nagyszámú, fehérjét nem kódoló DNS-szakasz van, ezek egy része az ún. mikroszatelliták, amelyek mono-, di-, tri-, tetra-, penta- vagy hexanukleotid ismétlődések. A daganatokban ezeket is érinthetik mutációk, a rövidebbek inkább hosszabbodnak, míg a hosszabbak inkább rövidülnek. Amennyiben az MMR-gének mutálódnak, elvesznek vagy epigenetikusan kikapcsolódnak (dMMR: mismatch repair deficiencia), ez a funkció nem működik, és a mikroszatellitákban jellegzetes eltérések fixálódnak: mikroszatellita-instabilitás alakul ki (MSI). A dMMR státusz elméletileg öt, de gyakorlatilag négy enzim hibáját jelenti, amelyek jellegzetes funkcionális párban működnek, az MLH1 a PMS2-vel, míg az MSH2 az MSH6-tal kooperál. Érdekes módon a TMB mértéke nem azonos az egyes funkcionális párok kiesése esetében, az MSH2/MSH6 vesztesékor nagyobb a mutációs terhelés, mint az MLH1/PMS2 károsodásakor [2].

A dMMR genetikai állapot ugyan bármely daganatfélésegekben előfordulhat, de a leggyakoribb az endometrium, a gyomor és a vastagbél rákjaiban, ahol 20-30%-os gyakoriságról szólnak az irodalmi adatok [3]. Az első hazai adatok 2010-ből vastagbélrákokban 19%-os gyakoriságot jeleztek [4]. Egy újabb hazai elemzésben, amely dMMR-gyakoriságot vizsgált (IHC), vastagbélrákban 17-24%-ot, míg endometriumrákban 33-52%-ot talált [5]. Miután korábban fény derült arra, hogy ezen daganatok egy része örökletes, amit az MMR-gének csírasejtes mutációja okoz, kidolgozták a genetikai hibatípus diagnosztikáját, amely az MMR-fehérjék immunhisztokémiai kimutatásán, az MSI-státusz PCR-es detektálásán és az MMR-gének mutációinak azonosításán alapul [6, 7]. Megjegyzendő, hogy az MSH2 gén kiesése az EpCAM génhibájának is lehet következménye [2].

A daganatok immunellenőrzőpont-gátló (immune checkpoint inhibitor, ICI) kezelésének kidolgozása során fény derült

arra, hogy ezek a terápiák sokkal hatékonyabban működnek, ha a daganatokban magas a TMB, aminek egyik oka lehet az MSI-státusz. Így kerültek törzskönyvezésre az immunellenőrzőpont-gátlók, melyek kísérő diagnosztikája az MMR-IHC vagy az MSI-PCR vizsgálaton alapul [8]. Az első daganatféleség, ahol ilyen indikáció született, a vastagbélrák, majd ez lett az első ún. tumornagyszintű célzott terápiás indikáció, ami a dMMR/MSI vizsgálatok drámai felfutását okozta [9-11].

Az MSI/dMMR diagnosztikai ajánlások a Lynch-szindróma diagnosztikai protokollján alapulnak mind a mai napig. A jelenleg érvényes ESMO-ajánlásban három diagnosztikus teszt szerepel: 1) az MMR-fehérje-IHC, 2) a PCR-es MSI-diagnosztika és 3) az NGS-alapú TMB-meghatározás [12, 13]. Korábban több dolgozatban is jeleztük a javasolt algoritmust [2, 14], amelyben első lépésként a négy MMR-fehérje IHC-kimutatása szerepelt; amennyiben mind a négy megtartott, MMR-megtartott állapotot lehet megállapítani, amikor nincsen további teendő. Ha akár csak egy fehérje teljes kiesése is látható IHC-vel, ez MMR-hiányosságnak tekintendő, és az MSI-státusz megerősítése javasolt PCR-vizsgálattal: a nemzetközi szakmai ajánlásoknak megfelelően öt mikroszatellita-markert kell vizsgálni. A rendelkezésre álló tesztek a BAT-25 és BAT-26 mononukleotidák esetében átfednek, de az érzékenyebb tesztben NR-21, NR-24, NR-27 mononukleotidák, míg a kevésbé érzékenyben a D2S123, D17S250, D5S346 dinukleotidák szerepelnek. Az MSI-H státuszt biztonsággal minimum 2 marker eltéréssel kell igazolni. Amennyiben csak egy marker változott, ez nem fogadható el MSI-H státusznak (MSI-L). Diagnosztikus szempontból két következményt kell vizsgálni, a Lynch-szindróma igazolását, illetve az ICI-terápia indikációját. Ez utóbbihoz a törzskönyvezési vizsgálatok alapján az MMR-IHC megállapítása vagy az MSI-státusz PCR-vagy NGS-módszerrel történt kimutatása vezethet [12, 13].

Jelenleg nem ismeretes, hogy a hazai rosszindulatú daganatokban mi az MSI/dMMR genetikai eltérés gyakorisága, ezért célul tűztük ki ennek elemzését intézetünk elmúlt négy évének diagnosztikus gyakorlatában. Második célunk az volt, hogy összehasonlítsuk a két fő diagnosztikus módszer: az MMR-IHC és az MSI-PCR hatékonyságát, illetve az MMR-IHC prediktív szerepét az MSI-státusz szempontjából.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A jelenlegi retrospektív elemzést az SE-RKEB-62/2023 engedély birtokában végeztük. 2019. január 1. és 2022. december 31. között 1122 esetben végeztünk MSI/dMMR vizsgálatot a velünk kapcsolatban álló onkológiai centrumok számára. A beküldött daganatok típusait az 1. táblázat mutatja. A mintákat minőség-ellenőrzés után molekuláris patológiai vizsgálatnak vetettük alá.

MMR-IHC

Az FFPE (formalinfixált, paraffinba ágyazott) metszeteken az MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2 proteinek immunhisztokémiai meghatározását végeztük VENTANA MMR RxDx kit segítségével.

Rövidítések:

BER: bázisexcíziós repair, **dMMR:** mismatch repair deficiencia, **HRR:** homológ rekombinációs repair, **IHC:** immunhisztokémia, **MMR:** mismatch repair, **MSI:** mikroszatellita-instabilitás, **MSI-H:** MSI magas foka, **MSI-L:** MSI alacsony foka, **NER:** nukleotidexcíziós repair, **NGS:** újgenerációs szekvenálás, **NHEJ:** nem homológ végkapcsolás repair, **PCR:** polimeráz láncreakció, **pMMR:** mismatch repair megtartottság, **TCGA:** The Cancer Genome Atlas, **TMB:** tumormutációs terhelés

gével (ahol az anti-MLH1, anti-PMS2 és anti-MSH2 antitestek egér, míg az anti-MSH6 antitest nyúl monoklonálisok voltak), amelyet a Ventana OptiView előhívóval detektáltunk a Ventana/Benchmark immunautomatán. A dMMR státusz felállításához

1. TÁBLÁZAT. MMR-IHC és MSI-PCR vizsgálatok megoszlása daganatfélések szerint

Daganattípus	Eset-szám	MSI-PCR (n)	MMR-IHC (n)	MSI+MMR (n)
Összes daganat	1122	742	836	527
Kolorektális rák	834	538	651	401
Gyomorrák	24	22	18	18
Endometriumrák	31	27	24	21
Hasnyálmirigyrák	32	25	19	13
Nyelőcsőrák	11	11	11	11
Petefészekrák	15	11	12	8

IHC: immunhisztokémia, MMR: mismatch repair, MSI: mikroszatellita-instabilitás, PCR: polimeráz láncreakció

2. TÁBLÁZAT. Az MSI-H státusz gyakorisága különféle daganatokban

Karcinóma	n	MSI-H	%	Hause (3)*	Chen (6)*
Kolorektális	538	76	14,1	22	13
Vastagbél	363	67	18,5	19	
Rektum	175	9	5,1	3	
Gyomor	22	3	13,6	19	11
Méhtest	27	12	44,4	30	26
Hasnyálmirigy	25	2	8,0	2	
Petefészek	11	0	0	2	8

MSI-H: mikroszatellita-instabilitás magas foka

* Közölt nemzetközi adatok

3. TÁBLÁZAT. Az MMR-deficiencia (dMMR) gyakorisága különféle daganatokban

Karcinóma	n	dMMR	%	Jaffrelot (16)*
Kolorektális	651	99	15,2	10
Vastagbél	416	72	17,3	
Rektum	235	27	11,5	
Gyomor	18	4	22,2	8
Méhtest	24	13	54,2	25
Hasnyálmirigy	19	2	10,5	
Petefészek	12	2	16,7	11

* Közölt nemzetközi adatok

minimum egy MMR-fehérje teljes negativitására volt szükség a daganatban (>90%). Az aberráns MMR IHC-diagnózis feltételei minimum egy MMR-fehérje elvesztése a daganatsejtek több mint 10%-ában, vagy a festődési intenzitás jelentős csökkenése a stromális sejtekben észlelt intenzitáshoz képest, vagy a daganatban világosan elhatárolódó, negatív klónokból álló területek voltak (15, 16).

MSI (Promega MSI)

Az FFPE-mintákból DNS-t izoláltunk a Maxwell 16 FFPE Plus DNS-izolálóval, majd az MSI-státuszt a Promega MSI-markereinek segítségével PCR-rel határoztuk meg ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystem) segítségével. A mikroszatellita-markerek az NR-21, NR-24, valamint a BAT-25, BAT-26 és a MONO-27 voltak. Az elektroforetogramokat az MSI Analysis System segítségével értékeltük (Promega). Az értékeléskor az MSS státuszt mind az öt mikroszatellita-marker érintetlensége esetén definiáltuk, MSI-H státuszt akkor állítottunk fel, ha az öt marker közül legalább 2 mutatott instabilitást. Amennyiben csak egy marker volt instabil, akkor MSI-L státuszúnak tekintettük a daganatot (12–14). A módszer specificitása 90%, szenzitivitása 90%. Az alacsony tumor/normál arányú esetekben (<20%) a felhasznált metszeteken makrodisszekciót alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

Intézetünkben az elmúlt 4 évben több mint ezer MMR/MSI vizsgálatot végeztünk, amelyek közül 527 esetben a PCR- és IHC-eljárást párhuzamosan végeztük el (1. táblázat). A vizsgálatok döntő többségét a kolorektális rákok elemzése adta, és bár számos daganatfélésegekben végeztünk igen kisszámú vizsgálatot, a további elemzésben csak azokkal foglalkoztunk, amelyekből több mint tíz vizsgálat készült legalább valamelyik teszttípus esetében.

Az MSI-H státusz gyakorisága 13,9%-nak, míg az MSI-L 6,2%-nak adódott a teljes daganatcsoportban. Az elemzésben a kolorektális rák kategórián belül elvégeztük az elemzést a vastagbél- és végbélrákokra is, mivel nemzetközi elemzésekben eltérő incidenciákkal lehet találkozni (3, 17). Intézetünkben a kolorektális rákok MSI-H státuszának gyakorisága 14,1%-nak adódott, ezen belül a vastagbélrákoké ennél magasabb, a végbélrákoké jelentősen alacsonyabbnak bizonyult (2. táblázat). A gyomorrákok MSI-H státuszának gyakorisága hasonló volt a kolorektális rákokéhoz, de feltűnő volt a méhtrákómban igazolt magasabb MSI-H-incidencia, amit a viszonylag alacsony számú ilyen vizsgálat is magyarázhat. MSI-H státuszt eddig mi nem észleltünk petefészekrákban, és meglehetősen ritka volt hasnyálmirigyrák esetében is (2. táblázat). A TCGA elemzésének adatai alapján kijelenthetjük, hogy az MSI-H incidenciája hazánkban hasonló a nemzetközi adatokhoz, amit egy friss metaanalízis adatai is megerősítettek (3, 17).

A dMMR IHC-státusz gyakorisága hasonló volt az MSI-H státuszéhoz. Jelentősebb eltérésnek lehet tekinteni a petefészekrákokat, ahol 2 esetben is észleltünk dMMR-t (3.

4. TÁBLÁZAT. Az MMR-IHC prediktív szerepe az MSI-státusz predikciójában

	n	Eltérés n (%)	MSS n (%)	MSI-L n (%)	MSI-H n (%)
Összes daganat	527	80 (15,2)			
pMMR	391		356 (91,0)	28 (7,2)	7 (1,8)
dMMR	136		65 (47,8)	7 (5,1)	64 (47,1)
Kolorektális rák	401	56 (14,0)			
pMMR	298		272 (91,3)	21 (7,0)	5 (1,7)
dMMR	103		47 (45,6)	4 (3,9)	52 (50,5)
Nem kolorektális	90	17 (18,9)			
pMMR	65		60 (90,9)	4 (6,2)	1 (1,5)
dMMR	25		13 (52,0)	3 (12,0)	9 (36,0)

IHC: immunhisztokémia, dMMR: mismatch repair deficiencia, pMMR: mismatch repair megtartott, MSI-H: mikroszatellita-instabilitás magas foka, MSI-L: mikroszatellita-instabilitás alacsony foka, MSS: mikroszatellita-stabilitás

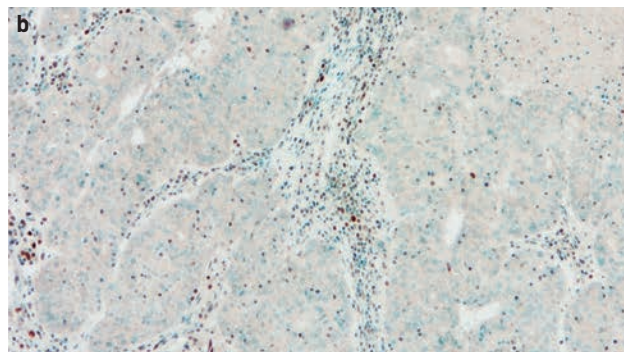
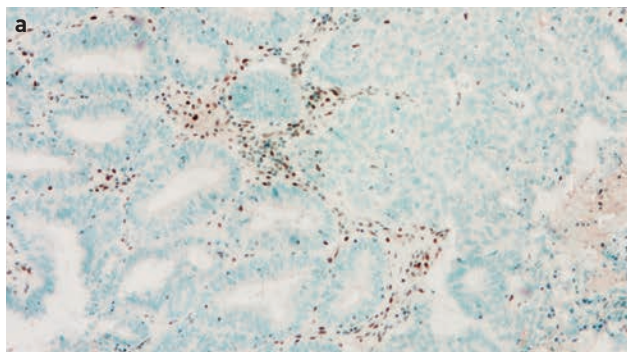
táblázat). Sajnos az irodalomban a dMMR incidenciájára vonatkozó elemzés ritka, egy friss metaanalízis adatai a hazai incidenciánál alacsonyabb értékeket adtak meg a kolorektális, gyomor- és méhtestrákokra [17].

Irodalmi adatok alapján az MSI-státusz a vastagbélrákok stádiumának emelkedésével csökken [12, 13]. Ezért megnéztük, hogy a 74 májmetasztázis elemzésével milyen MSI-H-incidencia társul, és ez 4,2%-nak adódott, míg a dMMR incidenciája 10,8% volt, mely értékek jóval elmaradnak a primer tumorok adataitól [2., 3. táblázat].

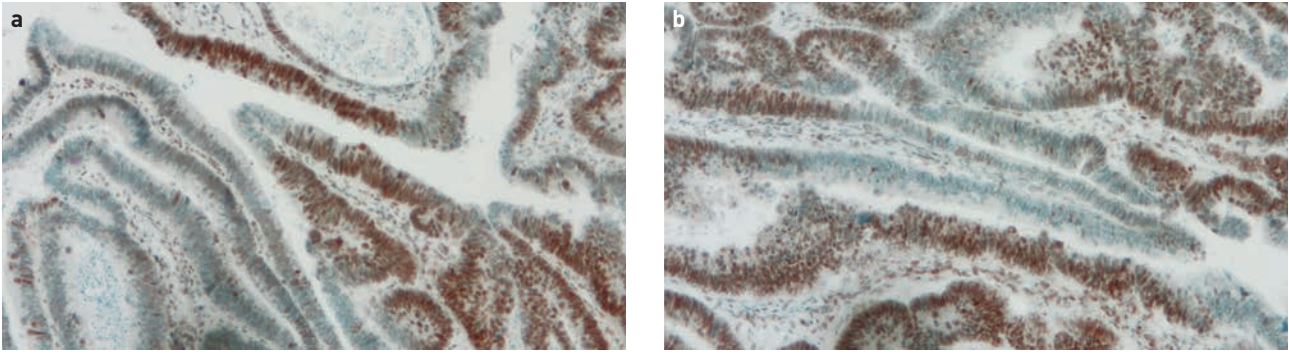
Miután a nemzetközi protokollok alapján a daganatok immunterápiájának pozitív prediktív markere az MSI-H vagy a MMR-fehérjevesztés (dMMR) állapot, megvizsgáltuk, hogy az immunhisztokémiai MMR-státusz mennyiben képes prediktálni az MSI-állapotot, amit 527, párhuzamosan végzett vizsgálat alapján végeztünk el. Az elemzést elvégeztük a teljes kohorszra és külön a kolorektális rákokra is. Az MMR-megtartott (pMMR) állapot nagyon jó hatásfokkal volt képes megjósolni az MSS vagy MSI-L státuszt és csak

~2%-ban tartalmazott MSI-H státuszú daganatot (álnegativitás) [4. táblázat]. Ezzel szemben a dMMR státusz nagyon alacsony hatásfokkal jelezte előre az MSI-H státuszt, az esetek kevesebb mint 50%-ában, és feltűnő volt az, hogy milyen nagy arányú volt az MSS státusz. A dMMR esetében az álpozitivitási arány 53,7%-nak adódott. Ezek az eltérések hasonlóak voltak a nem kolorektális rákok esetében is. Azt is megvizsgáltuk, hogy az MMR-IHC-vizsgálat milyen arányban klasszifikálta helytelenül az MSI-H státuszt, ami a terápiás indikáció szempontjából releváns kérdés. Ebben a nagy anyagban az 527 vizsgált eset közül 15,2% volt a helytelen besorolás, ami 80 beteget érintett [4. táblázat].

A nemzetközi protokollok alapján az MSI-PCR-vizsgálatot a <20%-os tumor/normál arányú esetekben nem lehet elvégezni [15]. Az általunk vizsgált kohorszban az ilyen minták aránya igen magas volt (27,5%), ezért az elemzést külön is elvégeztük a 20%-nál nagyobb arányú esetekre, azonban a dMMR prediktív potenciálja nem változott ebben az alcsoportban sem (nem közölt adatok), így kijelenthetjük,



1. ÁBRA. Klasszikus MMR-deficiencia vastagbélrákban. **a)** MLH1-magfestődés negativitása a daganatsejtek 100%-ában. **b)** PMS2-magfestődés negativitása a daganatsejtek 100%-ában. Megjegyzés: a stromális normál sejtek mindkét reakció esetében megtartottak



2. ÁBRA. Abnormális MMR-immunhisztokémiai reakció vastagbélrákban. **a)** MSH2-magfestődés fokális kiesése a daganatsejtekben. **b)** MSH6-magfestődés kiesése a daganatsejtek egy kis százalékában

hogya a nagyarányú eltérések oka nem az alacsony tumor-sejtarány volt.

Felmerült, hogy ezen nagyarányú dMMR/MSI eltérések háttérében az immunfenotípus sajátosságai állnak, tehát az, hogy klasszikus formában jelentkezik (kettős kiesés: MLH1/PMS2 vagy MSH2/MSH6, 1. ábra), vagy nem klasszikus formában (egyes vagy >2 kiesés), illetve egyéb, ún. aberráns típusú (2. ábra). Ez utóbbi kategóriát az irodalom alapján állítottuk fel (16, 20) és 50 esetben fordult elő, azonban ezeket az eseteket eddig a kettős kohorszba nem számítottuk be. Az MSI-H státusz predikciója a dMMR típusa szerint legjobb a klasszikus kettős kiesés esetén volt, de itt is csak ~50%-os, ennél alacsonyabb volt a nem klasszikus forma esetében (~30%), és ahogy az várható volt, legalacsonyabbnak az ún. aberráns forma esetén bizonyult (6%) (5. táblázat). Megjegyzendő, hogy a kolorektális rákok vonatkozásában ezek az értékek igen hasonlóak voltak.

MEGBESZÉLÉS

Az MSI-H genetikai státusz incidenciája hazánkban nem ismert. Az első 2010-es közlemény, amelynek eredeti célja nem ez volt, 19%-os adattal szolgált vastagbélrákban, azonban a meghatározás módja nem felelt meg a mai molekuláris patológiai standardoknak (4). Az elmúlt 4 évben intézetünkben több mint ezer ilyen vizsgálat készült, részben a 4 markeres IHC, részben a Pentaplex-PCR segítségével, döntően az immunellenőrzőpont-gátló kezelések alkalmazásának predikciójára. Megjegyzendő, hogy a Lynch-szindróma diagnosztikája szempontjából is fontos volna ezen vizsgálatok rendszeres végzése, azonban intézetünkben ez meglehetősen ritka. A PCR-módszer alapú MSI-H-incidencia vastagbélrákban közel áll a TCGA (3) és egy nagy metaanalízis adataihoz: ~15%, ezen belül a végbélrákban jóval alacsonyabb (17). Az IHC alapján meghatározott dMMR-incidenciaérték vastagbélrákban nagyon hasonló volt az MSI-alapúhoz, de az irodalmi adatok feletti értéket mutatott (3, 17), és ez szembetűnően magasabb volt az MSI-PCR-rel mért adatoknál. Más daganatfélésegekből lényegesen alacsonyabb számban végeztük el ezeket a vizsgálatokat, 20 feletti esetszám gyomor-, méhtest-, petefészek- és hasnyálmirigyrák eseteiben áll rendelkezésre. Ezekben a daganatokban az incidenciaadatok jelentősen eltérnek az irodalmiaktól, amit az alacsony esetszámmal magyarázunk. Mindenesetre az egyértelmű, hogy a méhestrákban az MSI-H/dMMR gyakorisága intézetünkben is jóval magasabb a többi daganathoz képest, hasonlóan a nemzetközi megfigyelésekhez (17, 18). Ennek oka lehet az örökletes háttér, a Lynch-szindróma, amelynek egyik fő manifesztációja a méhestrák.

Az immunellenőrzőpont-gátlók alkalmazásának előfeltétele a dMMR vagy MSI-H genetikai státusz igazolása IHC-vagy PCR-vizsgálattal, mivel ezen módszerek egyenértékűnek tekintendők ebből a szempontból (12, 13). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az immunterapeutikumok hatásossága szempontjából az MMR-rendszer funkcionális defektusának van prediktív szerepe, amely megemeli a TMB-értéket, ami a nagyszámú új neoantigén révén intenzívebb daganatelle-

5. TÁBLÁZAT. Az MMR-deficiencia prediktivitása az immunfenotípus alapján

	dMMR – klasszikus	dMMR – nem klasszikus	dMMR – aberráns
Összes daganat			
n	87	49	50
MSS	35 (40,2%)	30 (61,2%)	33 (66,0%)
MSI-L	4 (4,6%)	3 (6,1%)	14 (28,0%)
MSI-H	48 (55,2%)	16 (32,7%)	3 (6,0%)
Kolorektális rák			
n	65	38	38
MSS	25 (38,5%)	22 (57,9%)	29 (76,3%)
MSI-L	1 (1,5%)	3 (7,9%)	6 (15,8%)
MSI-H	39 (60,0%)	13 (34,2%)	3 (7,9%)

dMMR: mismatch repair deficiencia, MSI-H: mikroszatellita-instabilitás magas foka, MSI-L: mikroszatellita-instabilitás alacsony foka, MSS: mikroszatellita-stabilitás

nes immunválaszt vált ki [1, 2, 8]. Ezért az elmúlt években intézetünkben az MMR-rendszer hibáját IHC-módszerrel fehérjeszinten és PCR-módszerrel is párhuzamosan vizsgáljuk. Jelen elemzésünkben összehasonlítottuk a két módszert, és azt elemeztük, hogy az MMR-IHC mennyire pontosan jelzi az MSI-H státuszt. Irodalmi adatok igen nagyfokú egyenértékűséget igazoltak korábban (>95%), bár az alkalmazott IHC-tesztek és a PCR-módszerek heterogének voltak, illetve gyakran nem feleltek meg a mai kívánalmaknak [18]. Saját anyagunk esetében a két módszer eltérése a végső MMR-státusz megítélésben ~15%-nak adódott, ami magasabb a korábbi közleményekhez képest [20, 21]. Ezen belül azonban egyértelmű volt, hogy az MMR-IHC a megtartott MMR-proteinexpresszióval jellemzett daganatokban valóban igen magas korrelációt mutatott az MSS/MSI-L státusszal (~98%). A részletesebb analízis ugyanakkor kimutatta, hogy az IHC-vel MMR-deficiensnek diagnosztizált daganatok esetében az MSI-H státusz predikciója nem éri el az 50%-ot. Újra kiemeljük, hogy az IHC-vizsgálat kivitelezése során a nemzetközi standardokat követtük [12, 13]. Másrészt pedig az általunk alkalmazott Pentaplex PCR-módszer megfelel a szigorú nemzetközi standardoknak. Megjegyzendő, hogy az eltérések gyakorisága a vastagbél- vagy a nem vastagbélrákok esetében igen hasonló volt. Egy korábbi vizsgálatban, amelyben referenciaként az ún. Bethesda PCR-panelt használták, melyet kevésbé érzékenynek tekintenek, nagyon hasonló eredményre jutottak kínai szerzők [22], de egy olasz munkacsoport tanulmányában is hasonló eltéréseket lehetett észlelni, amit döntően ún. preklinikai tényezőknek tulajdonítottak (hosszú formalinfixálás, alacsony sejtszám, mucinózus hisztológia), amelyek az immunfestést károsan érinthetik [23]. Egy nagy francia elemzésben, amelyben heterogén IHC-tesztelési stratégiát és többféle PCR-módszert is használtak, az eltérési arány vastagbélrákban 3,8%-nak adódott [19]. Egy kis mintán végzett holland összehasonlító elemzésben vastagbélrákban a dMMR a PCR-rel 96,3%-os egyezést mutatott, míg endometriális rákban csak 66,7%-osat [24]. Egy német elemzésben, amelyet endometriális rákokra végeztek el, a dMMR/PCR egyezési arány 68%-os volt [25]. Mindkét utóbbi elemzésben a pMMR/PCR egyezési arány közelítette a 100%-ot.

A dMMR IHC- és az MSI-H PCR-eredmények eltéréseinek magyarázatára elsőként szokás technikai okokat említeni. Vizsgálatunkban azokat az eseteket nem értékeltük az összehasonlításban, ahol az IHC elvégzésének, illetve eredményének egyértelműen technikai okai voltak. Ennek ellenére a nemzetközi tapasztalatok és vizsgálatok az

MMR-IHC viszonylag alacsony érzékenységét preanalitikai okokkal magyarázzák [20, 23]. Második okként szokott szerepelni az MMR-IHC problémájaként az ún. nem klasszikus mintázat megjelenése. Elemzésünkben ezért külön is összehasonlítottuk a klasszikus dMMR-t ebből a szempontból, és nagy meglepetésünkre hasonló gyakoriságú eltéréseket észleltünk az MSI-H státusz predikciójában. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a dMMR prediktív ereje jelentősen alacsonyabb volt a nem klasszikus dMMR esetekben (egyes vagy több mint 2 fehérje kiesése). Újabbán egyre több irodalmi adat szól arról, hogy a dMMR IHC-mintázat sokkal heterogénebb lehet, és a teljes kiesés mellett előfordulhatnak heterogén klónok teljes kieséssel vagy csökkent intenzitású magi reakciók is, melyeket szokatlan vagy aberráns mintázatoknak neveznek [16, 20]. Anyagunkban ~10%-os gyakorisággal fordultak elő ilyen esetek, amelyek elemzése azt mutatta, hogy ezeknél az MSI-H státusz csak alacsony gyakorisággal mutatható ki [6%], azonban ezeket az eseteket az analízisünk nem tartalmazta.

Az MSI-PCR és az MMR-IHC eredmények eltéréseinek további oka lehet a minták alacsony tumorsejtszázaléka, ami miatt a nemzetközi ajánlások 20%-os határértéket jelölnek meg a PCR-vizsgálat elvégezhetőségének határértékeként [16, 20]. Anyagunkban az ilyen esetek aránya 27,5% volt. Amennyiben ezeket az eseteket nem vettük figyelembe az analízis során, az eltérések gyakorisága és jellege (dMMR alacsony specificitása) nem változott. Ennek magyarázata lehet az, hogy az ilyen alacsony tumorsejtarányú minták esetében makrodisszekciót alkalmaztunk.

A továbbiakban felmerül a kérdés, mennyiben kell vagy lehet követni a nemzetközi protokollokat. Megjegyzendő, hogy ezeket jellemzően a Lynch-szindróma diagnosztizálására fejlesztették ki, majd leegyszerűsítve vették át az immunterápia prediktív diagnosztikájára. Véleményünk szerint az MMR-IHC tesztnek fontos előszűrő szerepe van továbbra is, azonban látható, hogy csak az MMR-fehérjék megtartott festődése (pMMR) alkalmas önmagában az MSS/MSI-L genetikai státusz predikciójára nagy specificitással és szenzitivitással. Amennyiben az MMR-IHC kóros fenotípust jelez, célszerű PCR-vizsgálatot végezni a nemzetközi standard ötmarkeres protokollal, mert így van esély az MSI-H daganatok hatékony kiszűrésére, ellenkező esetben az onkoteam sorozatban hozhat hibás döntést az immunterápia indikációjára. Tekintettel ezen terápiák magas költségére, ilyen esetekben a viszonylag olcsó, de igen specifikus és szenzitív PCR-vizsgálat vagy az 500 génes nagypaneles NGS-vizsgálat, a TMB elvégzése indokolt lehet.

IRODALOM

1. Szállási Z, Sztupinszki Zs, Moldvay J. DNS-javító mechanizmusok hiánya szolid tumorokban. *Klin Onkol* 9:375–386, 2022
2. Sükösd F. Mikroszatelliták mint a genom szeizmográfjai. *Klin Onkol* 8:143–150, 2021
3. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterisation of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 22:1342–1349, 2016
4. Szentirmay Z, Gallai M, Serester O, et al. A mikrosatellita-státus és a morfológia összefüggése vastagbélrákokban. *Magy Onkol* 54:169–178, 2010
5. Regős E, Lotz G. Az immuncheckpoint-gátlók biomarkereinek molekuláris diagnosztikai vizsgálata. *Orvosképzés* 3:469–477, 2021
6. Chen W, Swanson BJ, Frankel W. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol* 12:24, 2017
7. Abildgaard AB, Nielsen SV, Bernstein I, et al. Lynch syndrome, molecular mechanisms and variant classification. *Br J Cancer* 128:726–734, 2022
8. Palmeri M, Mehnert J, Silk AW, et al. Real-world application of tumor mutational burden-high (TMB-high) and microsatellite instability (MSI) confirms their utility as immunotherapy biomarkers. *ESMO Open* 7:100336, 2022
9. Le DT, Kim WT, Van Cutsem E, et al. Phase-II open label study of pembrolizumab in treatment refractory, microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer. KEYNOTE-164. *J Clin Oncol* 38:11–19, 2020
10. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142). *Lancet Oncol* 18:1182–1191, 2017
11. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer. *J Clin Oncol* 38:1–10, 2019
12. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumor mutational burden. *Ann Oncol* 30:1232–1243, 2019
13. Yoshino T, Pentheroudakis G, Mishima S, et al. JSCO-ESMO-ASCO-JSMO-TOS: international expert consensus recommendations for tumor-agnostic treatments in patients with solid tumors with microsatellite instability or NTRK fusion. *Ann Oncol* 31:861–871, 2020
14. Tímár J, Ladányi A. A datatok immunterápiájának prediktív markerei, a PD-L1-meghatározás gyakorlati kérdései. *Magy Onkol* 61:158–166, 2017
15. McCarthy AJ, Capo-Chichi J-M, Spence T, et al. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *J Pathol Clin Res* 5:115–129, 2019
16. Jaffrelot M, Fares N, Brunac AC, et al. An unusual phenotype occurs in 15% of mismatch repair-deficient tumors and is associated with non-colorectal cancers and genetic syndromes. *Mod Pathol* 35:427–437, 2022
17. Lorenzi M, Amonkar M, Zhang J, et al. Epidemiology of microsatellite instability high (MSI-H) and deficient mismatch repair (dMMR) in solid tumors: a structured literature review. *J Oncol* 2020:1807929, 2020
18. Quaas A, Rehkaemper J, Rueschoff J, et al. Occurrence of high microsatellite-instability/mismatch repair deficiency in nearly 200 human adenocarcinomas of the gastrointestinal tract, pancreas and bile duct: a study from a large German Comprehensive Cancer Center. *Front Oncol* 11:569475, 2021
19. Desalins AGD, Tachon G, Cohen R, et al. Discordance between immunohistochemistry of mismatch repair proteins and molecular testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *ESMO Open* 3:100120, 2021
20. Wang C, Zhang L, Vakiani E, Shia J. Detecting mismatch repair deficiency in solid neoplasms: immunohistochemistry, microsatellite instability or both? *Mod Pathol* 35:1515–1528, 2022
21. Andre T, Cohen R, Salem ME. Immune checkpoint blockade therapy in patients with colorectal cancer harboring microsatellite instability/mismatch repair deficiency in 2022. *ASCO Educational Book*, 2022, pp. 1–8
22. Chen ML, Chen JY, Hu J, et al. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *Int J Exp Pathol* 11:1431–1438, 2018
23. Malapelle U, Parente P, Pepe F, et al. Impact of pre-analytical factors on MSI test accuracy in mucinous colorectal adenocarcinoma: a multi-assay concordance study. *Cells* 9:9092019, 2020
24. Dedeurwaerdere F, Claes KBM, Van Dorpe J, et al. Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer. *Sci Rep* 11:12880, 2021
25. Siemanowski J, Schöming-Markiefka B, Buhl T, et al. Managing difficulties of microsatellite instability testing in endometrial cancer. Limitations and advantages of four different PCR-based approaches. *Cancers* 13:1268, 2021