

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Сычевская К.А., Рисинская Н.В., Кравченко С.К., Никулина Е.Е., Мисюрин А.Е., Магомедова А.У., Судариков А.Б.

СЛОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МОНОНУКЛЕОТИДНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ (MSI) У БОЛЬНЫХ В-КЛЕТОЧНЫМИ ЛИМФОМАМИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия

Анализ микросателлитной нестабильности (MSI – microsatellite instability) является рутинным исследованием в диагностике солидных опухолей. Стандартом определения MSI служит пенталексная панель мононуклеотидных повторов: NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26. Факт наличия MSI устанавливается на основании различий длины маркеров в опухолевой и здоровой тканях, однако в силу квазимоморфного характера стандартных мононуклеотидных локусов появление опухолевых ПЦР-продуктов может быть идентифицировано без исследования парных образцов и использование контроля в диагностике MSI-позитивных солидных опухолей на настоящий момент не считается строго необходимым. Значение феномена MSI при гемобластозах исследовано недостаточно. В работе представлены результаты анализа MSI при В-клеточных лимфомах: фолликулярной лимфоме (ФЛ), диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ), В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности (HGBL). Показано, что абберации мононуклеотидных маркеров имеют место при перечисленных нозологиях, однако их характер не соответствует классическим проявлениям MSI при солидных новообразованиях. Этот факт требует дальнейшего изучения с позиций уточнения патогенеза подобных генетических нарушений. Ввиду возможности неоднозначной трактовки результатов исследования MSI при ранее не охарактеризованных заболеваниях строгое соблюдение методологии параллельного анализа опухолевой ткани и контрольного образца представляется обязательным.

Ключевые слова: генетическая нестабильность; короткие тандемные повторы (STR); микросателлитная нестабильность (MSI); потеря гетерозиготности (LOH); фолликулярная лимфома (ФЛ); диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ); В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности (HGBL); «stutter bands» (SB).

Для цитирования: Сычевская К.А., Рисинская Н.В., Кравченко С.К., Никулина Е.Е., Мисюрин А.Е., Магомедова А.У., Судариков А.Б. Сложности определения нестабильности мононуклеотидных микросателлитных повторов (MSI) у больных В-клеточными лимфомами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 181-186.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-181-186>

Sychevskaya K.A., Risinskaya N.V., Kravchenko S.K., Nikulina E.E., Misyurina A.E., Magomedova A.U., Sudarikov A.B.

PITFALLS IN MONONUCLEOTIDE MICROSATELLITE REPEATS INSTABILITY ASSESSING (MSI) IN THE PATIENTS WITH B-CELL LYMPHOMAS

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

Analysis of microsatellite instability (MSI) is a routine study in the diagnostics of solid malignancies. The standard for determining MSI is a pentaplex PCR panel of mononucleotide repeats: NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26. The presence of MSI is established based on differences in the length of markers in the tumor tissue and in the control, but due to the quasimonomorphic nature of standard mononucleotide loci the use of a control sample is not necessary in the diagnosis of MSI-positive solid tumors. The significance of the MSI phenomenon in oncohematology has not been established. This paper presents the results of a study of MSI in B-cell lymphomas: follicular lymphoma (FL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), high-grade B-cell lymphoma (HGBL). We have shown that aberrations of mononucleotide markers occur in these diseases, but the nature of the changes does not correspond to the classical MSI in solid neoplasms. This fact requires further study of the pathogenesis of such genetic disorders. Due to the possibility of ambiguous interpretation of the results of the MSI study for previously uncharacterized diseases, strict compliance with the methodology of parallel analysis of the tumor tissue and the control sample is mandatory.

Key words: genetic instability; short tandem repeats (STR); microsatellite instability (MSI); loss of heterozygosity (LOH); follicular lymphoma (FL); diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL); high-grade B-cell lymphoma (HGBL); “stutter bands” (SB).

For citation: Sychevskaya K.A., Risinskaya N.V., Kravchenko S.K., Nikulina E.E., Misyurina A.E., Magomedova A.U., Sudarikov A.B. Pitfalls in mononucleotide microsatellite repeats instability assessing (MSI) in the patients with B-cell lymphomas. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66(3): 181-186 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-181-186>

For correspondence: Sychevskaya Kseniia Andreevna, MD, hematologist, department of intensive high-dose hemoblastosis chemotherapy; e-mail: sychevskaya-ka@yandex.ru

Information about authors:

Sychevskaya K.A., <http://orcid.org/0000-0001-8053-9724>;
Risinskaya N.V., <http://orcid.org/0000-0003-2957-1619>;

Для корреспонденции: Сычевская Ксения Андреевна, врач-гематолог, отделение интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов с круглосуточными и дневным стационарами; e-mail: sychevskaya-ka@yandex.ru

Kravchenko S.K., <http://orcid.org/0000-0001-9086-8521>;
Nikulina E.E., <http://orcid.org/0000-0003-3914-8611>;
Misyurina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-9535-6688>;
Magomedova A.U., <http://orcid.org/0000-0003-4263-8275>;
Sudarikov A.B., <http://orcid.org/0000-0001-9463-9187>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 27.11.2020
Accepted 18.12.2020

Введение. В современной онкологической практике анализ микросателлитной нестабильности (MSI – microsatellite instability), генетических нарушений микросателлитов, или коротких tandemных повторов (STR – short tandem repeats), является рутинным исследованием, включенным в клинические рекомендации по ведению пациентов с раком толстой кишки [1]. Феномен MSI является уникальной особенностью группы больных наследственным неполипозным колоректальным раком, или синдромом Линча [2-3], для которого характерен дефицит белков комплекса репарации неспаренных нуклеотидов (MMR – mismatch repair) [4], обусловленный сочетанием врожденных гетерозиготных мутаций соответствующих генов и соматической инактивации второго аллеля в опухолевых клетках [5, 6]. Генетический профиль, впервые описанный для новообразований при синдроме Линча, также выявлен при ряде спорадических опухолей ЖКТ [7] и при некоторых опухолях иного гистогенетического происхождения, в частности, при раке эндометрия [8], раке предстательной железы [9] и др. Необходимость проведения анализа MSI солидных новообразований определена его клиническим значением, как метода стратификации пациентов с перечисленными нозологиями и выбора их последующей терапии. На примере колоректального рака доказана строгая ассоциация MSI с особенностями локализации первичной опухоли, морфологической картиной биоптата, низким риском метастазирования, благоприятным прогнозом выживаемости больных и высокой эффективностью противоопухолевых препаратов из группы ингибиторов иммунных контрольных точек [10, 11]. Подобные же зависимости прослеживаются и для пациентов с раком эндометрия [12].

Система MMR включает в себя несколько ключевых компонентов, из которых ферменты MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 регулируют репарацию коротких участков некомплементарности ДНК [13]. Функциональный дефицит именно этих белков встречается наиболее часто при MSI-позитивных опухолях и выражается преимущественно в аберрациях мононуклеотидных повторов. Первая широко признанная методика лабораторной диагностики MSI была предложена в 1997 году и известна как панель Bethesda [14]. Ее оригинальная редакция предполагает определение 5 микросателлитных маркеров (BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123, D17S250), из которых только два являются мононуклеотидными. Более высокая специфичность коротких микросателлитов, доказанная в ряде исследований [15, 16], обусловила создание диагностической панели MSI из пяти мононуклеотидных локусов (NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26), которая на настоящий момент является стандартом верификации MSI [17].

Технически стандартный анализ MSI заключается в специфической амплификации последовательностей мононуклеотидных повторов методом мультиплексной ПЦР с последующим фрагментным анализом смеси ПЦР-продуктов методом капиллярного гель-электрофореза. Различие длин амплифицированных участков при сравнении материала опухолевой ткани и контроля (как правило, клеток периферической крови того же пациента) расценивается как признак нестабильности по вовлеченному локусу. Мононуклеотидные маркеры диагностической панели MSI являются квазиоморфными [18], что означает высокую степень однотипности внешнего вида комплекса ПЦР-продуктов на электрофореграммах при подлежащем истинном генетическом разнообразии в силу гетерозиготного наследования аллельных вариантов микросателлитных повторов. Возможность существования подобного феномена обусловлена двумя причинами. Во-первых, спектр длин наиболее частых в популяции аллелей диагностических мононуклеотидных маркеров ограничен узким диапазоном в пределах 5-6 нуклеотидов, или квазиоморфным интервалом [17]. Во-вторых, амплификация микросателлитной ДНК методом ПЦР сопровождается обязательным артефактом, формированием ложных пиков амплификации, или “stutter bands” (SB) [17], вызванным “соскальзыванием” ДНК-полимеразы со “сложной” матрицы, распадом репликационной вилки и продолжением нового синтеза после некорректного спаривания цепей со сдвигом на кратное число мононуклеотидных мономеров [19]. В результате внешний вид электрофореграммы множественных ПЦР-продуктов напоминает нормальное распределение длин, среднее которого примерно соответствует длине истинных аллелей. В подобной ситуации определение факта гомо- или гетерозиготного носительства и различение отдельных аллельных вариантов практически лишено смысла из-за подавляющего фона SB.

Согласно результатам многочисленных исследований [15, 17, 20, 21], при MSI-позитивных опухолях длины опухолевых ПЦР-продуктов выходят за границы квазиоморфного интервала, что делает диагностику MSI возможной, несмотря на наличие артефакта. На этом основании рядом авторов [15, 17, 20] предполагалась целесообразность анализа MSI только материала опухоли без определения микросателлитного профиля контрольной ткани, что может быть особенно значимым при доступности только архивного материала, например, в практике работы консультативных центров, территориально разобщенных с местом наблюдения и лечения больных.

Несмотря на значительное число работ по MSI при солидных новообразованиях, феномен нестабильности

микросателлитов и нарушения MMR при гемобластозах в когортных исследованиях остается раскрытым недостаточно [22-24]. В рамках изучения MSI при лимфопролиферативных заболеваниях на примере фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (HGBL) нами была проанализирована частота aberrаций мононуклеотидных повторов при указанных нозологиях и впервые продемонстрирована высокая вероятность гетерозиготного наследования редких аллельных вариантов диагностических локусов. Сложности интерпретации результатов исследования предъявляют определенные требования к методике определения MSI у ранее не охарактеризованных групп пациентов.

Материал и методы. В исследование включили 53 больных ФЛ, 27 пациентов с ДВККЛ, 29 пациентов с HGBL, которые наблюдались в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ с 2010 г. по 2020 год. Группу сравнения составили 8 больных с неопухолевой лимфаденопатией (НЛ) по типу гранулематозного воспаления, преимущественно с саркоидозом, которые обследовались в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ с подозрением на гематологическое заболевание в течение последних двух лет.

Анализ профиля микросателлитных маркеров проводили в материале биоптата опухолевого лимфатического узла или аспирата костного мозга при его поражении, доказанном гистологически и при определении В-клеточной клональности по перестройкам генов иммуноглобулинов. В качестве контрольного образца здоровой ткани больного были использованы лейкоциты периферической крови или клетки аспирата костного мозга (в дебюте без вовлечения или после санации), что было доказано путем исключения В-клеточной клональности.

Выделение ДНК из замороженного материала и парафиновых блоков проводили описанным ранее способом [25, 26]. Определение концентрации раствора ДНК выполняли на флуориметре Qubit 4,0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Исследование MSI выполняли с использованием диагностической панели COrDIS MSI (ООО Гордиз, Россия), в которую включено 5 классических мононуклеотидных маркеров: NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25, BAT-26. Состав реакционной смеси соответствовал рекомендациям производителя. В каждую реакцию было внесено не менее 10 нг ДНК. Условия ПЦР реакции были следующими: 95°C (2 мин); 28 циклов: 95°C (10 сек), 58°C (30 с), 72°C (30 с); 68°C (10 мин). Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad, США). Последующий фрагментный анализ был выполнен на генетическом анализаторе Нанофор-05 (ООО Синтол, Россия).

Статистический анализ проводился в программах Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 13.0 (StatSoft, Россия). Парное сравнение выборок проводилось с использованием критерия χ^2 Пирсона.

Результаты. Aberrации мононуклеотидных повторов при сравнительном анализе материала опухолевой ткани и контроля были выявлены у 17 больных гемобластомами, что составило 15,6%. Среди них: у 4 пациентов с ФЛ (7,5%), у 3 пациентов с ДВККЛ (11%) и у 10 больных HGBL (34,5%). В тесте Пирсона статистически

значимых различий между группами ФЛ и ДВККЛ получено не было, в то время как частота генетических нарушений в группе HGBL значимо превышала таковую как в группе ФЛ ($df=1$, $\chi^2=9,61$, $p=0,002$), так и ДВККЛ ($df=1$, $\chi^2=4,28$, $p=0,039$) при парном сравнении. В группе пациентов с НЛ мутации микросателлитов не были обнаружены.

У всех пациентов генетические нарушения вовлекли только один локус из пяти. Исключение составил один больной HGBL, у которого были выявлены aberrации мононуклеотидных повторов в двух локусах.

При анализе случаев aberrаций мононуклеотидных повторов интерпретация электрофореграмм вызвала затруднения с позиций определения соответствия наблюдаемых нарушений феномену MSI. Классическая картина появления множественных опухолевых аллелей за пределами квазимономорфного интервала не была выявлена ни у одного больного. Все изменения микросателлитного профиля носили характер смещения максимума распределения длин в большую или меньшую сторону на 1-2 нуклеотида (рис. 1, а, б), и только в двух случаях в опухолевой ткани был достоверно визуализирован (рис. 1, в) единичный новый пик на границе распределения ПЦР-продуктов, соответствующего контролю. За исключением двух последних примеров, наблюдаемые aberrации могут соответствовать как MSI с изменением длины маркера на незначительное число нуклеотидов, так и потери гетерозиготности (LOH – loss of heterozygosity) с утратой одного из гетерозиготных аллелей, ранее не определяемого на фоне SB. При этом с учетом отсутствия расширения границ распределения длин ПЦР-продуктов, которое неизбежно должно было бы произойти за формирования SB вокруг нового опухолевого аллеля, последний вариант представляется более вероятным.

У 9 пациентов в объединенной когорте из 117 человек, что составило 7,7%, было выявлено гетерозиготное наследование редких вариантов аллелей, находящихся за пределами квазимономорфного интервала. При этом статистически значимых различий при уровне значимости $p<0,05$ между нозологическими формами (3 случая, 5,7%, ФЛ; 2 случая, 7,4%, ДВККЛ; 3 случая, 10%, HGBL; 1 случай, 12,5%, НЛ) обнаружено не было.

Внешний вид распределения длин ПЦР-продуктов при наличии редкого аллельного варианта в гетерозиготной форме подобен MSI и при изолированном исследовании только опухолевого материала неизбежно должен быть расценен в качестве генетического нарушения. В нашей работе параллельный анализ образцов здоровых клеток позволил верифицировать наблюдаемые изменения как проявление нормы. Примеры электрофореграмм при гетерозиготном наследовании редких аллелей представлены на рис. 2, а, б.

Статистически значимых различий между частотами aberrаций того или иного локуса выявлено не было (см. таблицу). Тем не менее, создается впечатление о более высокой частоте редких вариантов аллелей микросателлитов BAT-25 и NR-21, поскольку они были единственными, которые мы обнаружили в когорте из 117 пациентов.

Обсуждение. Согласно критериям Bethesda, наличие в пентаплексной панели двух или более локусов с мутациями микросателлитных повторов должно расцениваться как MSI высокой степени (MSI-H) [14]. Aberrации только одного маркера из пяти соответствуют

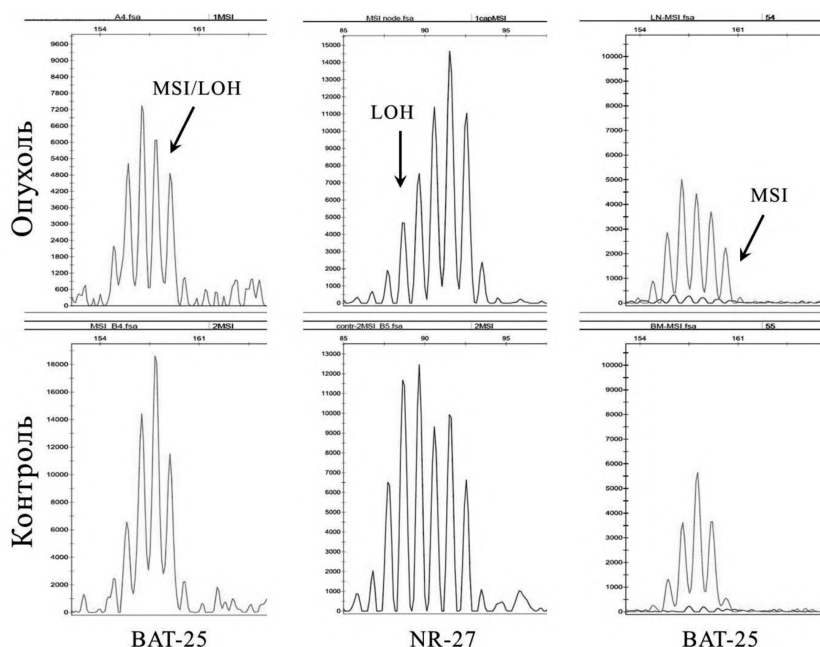


Рис. 1. Электрофореграммы случаев aberrаций мононуклеотидных локусов. *a* – пример невозможности дифференцировать MSI и LOH; *б* – пример достоверного определения LOH; *в* – пример достоверного определения MSI. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс – длина ПЦР продукта, п.н.; по оси ординат – интенсивность флуоресценции ПЦР-продукта.

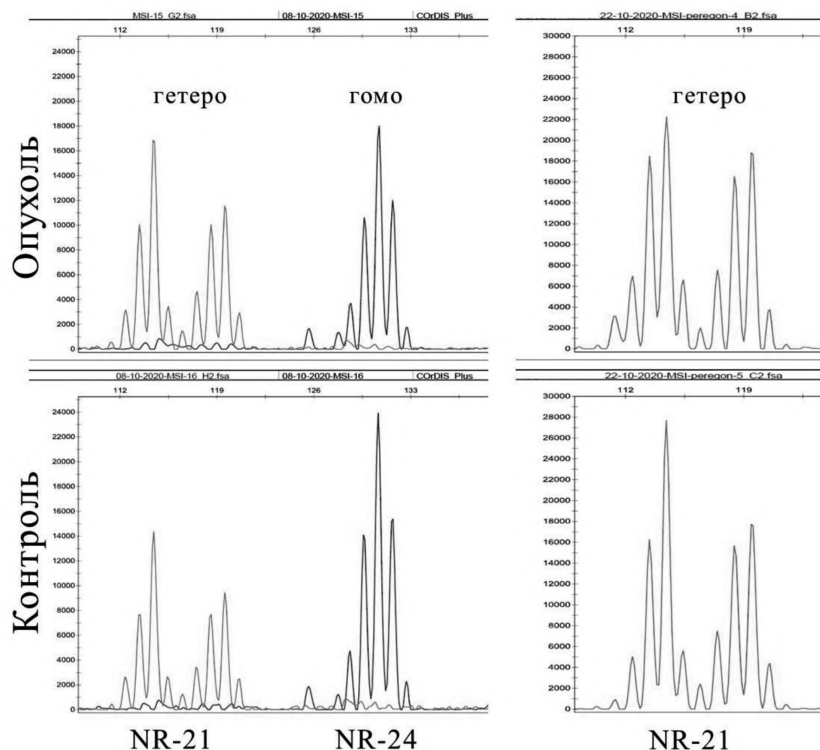


Рис. 2. Электрофореграммы случаев гетерозиготного наследования редких аллелей.

a – пример гетерозиготного и гомозиготного наследования у пациента с ДВККЛ; *б* – пример гетерозиготного наследования у пациента с HGBL.

MSI низкой степени (MSI-L) [14]. MSI-H характерна для синдрома Линча и подобных ему (Lynch-like) спорадических опухолей [7], в то время как MSI-L встречается

при многих других заболеваниях, что было продемонстрировано ранее [14], и не имеет на настоящий момент доказанного клинического значения, за исключением случаев колоректального рака, при котором MSI-L, как и феномен экспансии тетра-нуклеотидных повторов (EMAST – elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats), характеризует группу больных с агрессивным течением заболевания и неблагоприятным прогнозом [27, 28].

При солидных новообразованиях анализ aberrаций мононуклеотидных повторов, как правило, не вызывает затруднений, поскольку при MSI-H вследствие дефицита MMR происходят выраженные изменения исходных аллелей в сторону значимого уменьшения длины с формированием множественных новых ПЦР-продуктов. В предшествующих работах по исследованию мутаций микросателлитов было показано существование двух вариантов нестабильности, один из которых соответствует описанному выше, а другой отражает минимальные отклонения от контроля и появление опухолевого продукта только одной новой длины [29]. Авторами эти варианты были обозначены как тип I и тип II MSI, соответственно. MSI-H при синдроме Линча и Lynch-like новообразованиях всегда соответствует I типу нестабильности. Интересно, что длина интервала между нормальным и опухолевым ПЦР-продуктами при MSI, коррелирует с общей мутационной нагрузкой в кодирующей ДНК [30]. Вероятно, этот факт отражает связь между количеством репликационных циклов, выраженном в прогрессирующем накоплении мутаций микросателлитов, и линейным развитием опухоли этой группы.

В нашем исследовании только у одного пациента были выявлены aberrации двух микросателлитных локусов из пентаплексной панели. По формальным критериям Bethesda этот случай соответствует определению MSI-H [14], однако с учетом невозможности разграничения MSI и LOH по полученным электрофореграммам и как минимум их принадлежности к II типу нестабильности, следует признать, что феномен MSI-H в том качестве, в котором он известен при солидных опухолях, не имеет места при В-клеточных лимфомах. На этом же основании мы предполагаем, что дефицит ферментов комплекса MMR не принимает участия в развитии генетических нарушений микросателлитных повторов при исследованных нозологиях. Подобный вывод согласуется с результатами иммуногистохимического анализа экспрессии белков MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 [31-33].

Возвращаясь к вопросу невозможности дифференциации MSI и LOH, формирование SB следует признать основным техническим препятствием в решении данного вопроса. Причиной возникновения

Частоты генетических нарушений и гетерозиготного наследования редких аллелей по мононуклеотидным локусам

Показатели		BAT-25	BAT-26	NR-21	NR-24	NR-27
ФЛ	MSI/LOH	2/53* (3,8%)	0	1/53 (1,9%)	0	1/53 (1,9%)
	Гетеро	2/53 (3,8%)	0	1/53 (1,9%)	0	0
HGBL	MSI/LOH	3/27 (11,1%)	1/23 (4,3%)	3/28 (10,7%)	2/29 (6,9%)	2/29 (6,9%)
	Гетеро	1/27 (3,7%)	0	2/28 (7,1%)	0	0
ДВККЛ	MSI/LOH	3/27 (11,1%)	0	0	0	0
	Гетеро	0	0	2/27 (7,4%)	0	0
НЛ	MSI/LOH	0	0	0	0	0
	Гетеро	0	0	1/8 (12,5%)	0	0

Примечание. * – Вторая цифра каждой ячейки отражает число образцов с успешной амплификацией по конкретному локусу.

SB считают термические условия проведения ПЦР [34], поэтому в попытке уменьшить влияние артефакта на результат исследования MSI были апробированы разные варианты изотермической амплификации, такие как LAMP (loop-mediated isothermal amplification) [35] и RPA (recombinase polymerase amplification) [35]. Целевой результат уменьшения количества SB был достигнут только при применении методики RPA [34], которую можно признать альтернативой ПЦР при анализе MSI.

В нашем исследовании была продемонстрирована возможность гетерозиготного наследования редких вариантов аллелей мононуклеотидных локусов. В опубликованных ранее источниках вероятность обнаружения аллельных вариантов за пределами квазиморфного интервала варьировала от 0 до 57% по отдельным локусам в зависимости от выбранной этнической группы [17]. Согласно нашим результатам, частота выявления пациента с гетерозиготным носительством составила 2,6% для маркера BAT-25 и 5,1% для маркера NR-21 при вдвое меньшей аллельной частоте: 1,3% и 2,55% соответственно. Интерес подробного анализа этого феномена заключается в том, что в случае гетерозиготного носительства редкого аллеля изолированное исследование материала опухоли без контрольной ткани может привести к ложному выводу о наличии MSI. На настоящий момент параллельный анализ парных образцов является стандартом, однако с учетом квазиморфного характера мононуклеотидных локусов ранее высказывались предложения [15, 17, 20] о возможности упрощения методики и определения MSI только в биоптате. Следует отметить, что в клинической онкологической практике подобное предложение может быть правомочным, поскольку на больших когортах пациентов было доказано, что феномен MSI-H, определяющий прогноз заболевание и лечение, характеризуется сочетанием aberrаций нескольких микросателлитов, как правило, от 3 до 5 [17]. Вероятность подобного сочетания в силу совпадения редких аллельных вариантов стремится к нулю. Однако при изучении не охарактеризованных столь подробно групп больных в рамках экспериментальных исследований анализ каждого случая генетических нарушений имеет самостоятельное значение. Поэтому мы считаем нужным подчеркнуть, что определение микросателлитного профиля контрольного образца является обязательным при любых условиях,

возможность гетерозиготного наследования редких аллелей должна быть принята во внимание, а “неклассический” вид электрофореграммы квазиморфных локусов может быть вариантом нормы.

Определение клинического значения нарушений мононуклеотидных повторов у больных гемобластомами не являлось задачей настоящей работы методологического характера и будет выполнено коллективом авторов в последующем. Однако стоит отметить два следствия проведенного исследования, которые могут иметь практическое применение в клинической медицине. Во-первых, показанные различия между aberrациями микросателлитов при В-клеточных лимфомах и MSI при солидных опухолях не позволяют проводить параллель между этими феноменами и переносить закономерности формирования прогноза и терапии из онкологической практики в практику ведения гематологических больных. В первую очередь это касается перспектив применения ингибиторов иммунных контрольных точек, ниша использования которых в онкогематологии определена и, возможно, должна быть расширена, однако уже не на основании определения MSI.

Во-вторых, различия генетического профиля, выявленные между проанализированными нозологическими формами, могут отражать неизвестные ранее особенности патогенеза лимфом. Высокая степень генетической нестабильности, продемонстрированная для HGBL в ряде исследований [36, 37], согласуется с полученными нами результатами и показывает, что нарушения на разных уровнях организации ДНК взаимосвязаны и, вероятно, имеют общие причины. Более глубокое изучение механизмов генетической нестабильности необходимо для понимания путей лимфогенеза, что особенно актуально для разработки новых терапевтических подходов.

Заключение. В работе представлены результаты исследования MSI при В-клеточных лимфомах: ФЛ, ДВККЛ и HGBL. Показано, что частота aberrаций мононуклеотидных повторов при изученных нозологиях составляет 15,6%. Выявлены статистически значимые различия между группами: частота генетических нарушений при HGBL (34,5%) значительно превышает таковую при ФЛ (7,5%) и при ДВККЛ (11%), что может быть отягчением особенностей патогенеза этих заболеваний.

Характер изменений микросателлитов при В-клеточных лимфомах не соответствует стандартным проявлениям MSI при солидных новообразованиях. Aberrации мононуклеотидных повторов в материале биоптата были ограничены незначительными отклонениями от микросателлитного профиля контрольного образца на 1-2 нуклеотида. В большинстве случаев разделение феноменов MSI и LOH оказалось невозможным. Параллельный анализ опухолевой и контрольной ткани позволил выявить варианты гетерозиготного наследования редких аллелей квазиморфных мононуклеотидных локусов и исключить ложное определение MSI.

Различия между генетическими нарушениями при изученных В-клеточных лимфомах и MSI при солидных опухолях не позволяют проводить параллель между этими феноменами в онкогематологии и онкологии как с точки зрения особенностей их патогенеза, так и в отношении их клинического значения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-24, 26-37 см. REFERENCES)

25. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Кисилкина Д.Г., Наумова Е.В. и др. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 12:22-4, 33-5.

REFERENCES

- Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L., Singh N., Nottegar A., Bosse T. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann. Oncol.* 2019; 30(8):1232-43. doi: 10.1093/annonc/mdz116.
- Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993; 363(6429):558-61. doi:10.1038/363558a0.
- Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260(5109):816-9. doi:10.1126/science.8484122.
- Parsons R., Li G.M., Longley M.J., Fang W.H., Papadopoulos N., Jen J. et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*. 1993; 75(6):1227-36. doi: 10.1016/0092-8674(93)90331-j.
- Fishel R., Kolodner R.D. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995; 5(3):382-95. doi:10.1016/0959-437x(95)80055-7.
- Miyaki M., Konishi M., Tanaka K., Kikuchi-Yanoshita R., Muraoka M., Yasuno M. et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* 1997; 17(3):271-2. doi: 10.1038/ng1197-271.
- Boland C.R., Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6):2073-87.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064
- Hause R.J., Pritchard C.C., Shendure J., Salipante S.J. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat. Med.* 2016; 22(11):1342-50. doi:10.1038/nm.4191
- Fujimoto A., Fujita M., Hasegawa T., Wong J.H., Maejima K., Okusasaki A. et al. Comprehensive analysis of indels in whole-genome microsatellite regions and microsatellite instability across 21 cancer types. *Genome Res.* 2020 Mar 24; 30(3):334-46. doi: 10.1101/gr.255026.119.
- Gryfe R., Kim H., Hsieh E.T., Aronson M.D., Holowaty E.J., Bull S.B. et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342(2):69-77. doi: 10.1056/NEJM200001133420201.
- Oliveira A.F., Bretes L., Furtado I. Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic dMMR/MSI-H Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* 2019;9:396. doi:10.3389/fonc.2019.00396
- Kunitomi H., Banno K., Yanokura M., Takeda T., Iijima M., Nakamura K. et al. New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. *Oncol. Lett.* 2017; 14(3):3297-3301. doi: 10.3892/ol.2017.6640.
- Reyes G.X., Schmidt T.T., Kolodner R.D., Hombauer H. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma*. 2015; 124(4):443-62. doi:10.1007/s00412-015-0514-0.
- Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., Burt R.W. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58(22):5248-57.
- Suraweera N., Duval A., Reperant M., Vaury C., Furlan D., Leroy K. et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002; 123(6):1804-11. doi: 10.1053/gast.2002.37070.
- Wong Y.F., Cheung T.H., Lo K.W., Yim S.F., Chan L.K., Buhard O. et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis*. 2006; 27(5):951-5. doi: 10.1093/carcin/bgi333.
- Buhard O., Cattaneo F., Wong Y.F., Yim S.F., Friedman E., Flejou J.F. et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability

- status of human tumors. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(2):241-51. doi: 10.1200/JCO.2005.02.7227.
- Buhard O., Suraweera N., Lectard A., Duval A., Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis. Markers*. 2004; 20(4-5):251-7. doi: 10.1155/2004/159347.
 - Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5(6):435-45. doi: 10.1038/nrg1348.
 - Campanella N.C., Berardinelli G.N., Scapulatempo-Neto C., Viana D., Palmero E.L., Pereira R. et al. Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014; 22(7):875-80. doi: 10.1038/ejhg.2013.256
 - Goel A., Nagasaka T., Hamelin R., Boland C.R. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One*. 2010; 5(2):e9393. doi: 10.1371/journal.pone.0009393
 - Vanderwalde A., Spetzler D., Xiao N., Gatalica Z., Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med.* 2018; 7(3):746-756. doi:10.1002/cam4.1372
 - Trabucco S.E., Gowen K., Maund S.L., Sanford E., Fabrizio D.A., Hall M.J. et al. A Novel Next-Generation Sequencing Approach to Detecting Microsatellite Instability and Pan-Tumor Characterization of 1000 Microsatellite Instability-High Cases in 67,000 Patient Samples. *J. Mol. Diagn.* 2019; 21(6):1053-66. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.06.011.
 - Bonneville R., Krook M.A., Kautto E.A., Miya J., Wing M.R., Chen H.Z. et al. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol.* 2017; 1:1-12. doi: 10.1200/PO.17.00073.
 - Sidorova I.V., Sorokina T.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Kisisilichina D.G., Naumova E.V. et al. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2011; 12: 22-4, 33-5. (in Russian)
 - Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp. Dermatol.* 2012; 21(1):57-60. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x.
 - Carethers J.M. Microsatellite Instability Pathway and EMAST in Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 2017; 13(1):73-80. doi: 10.1007/s11888-017-0352-y.
 - Carethers J.M., Koi M., Tseng-Rogenski S.S. EMAST is a Form of Microsatellite Instability That is Initiated by Inflammation and Modulates Colorectal Cancer Progression. *Genes (Basel)*. 2015; 6(2):185-205. doi:10.3390/genes6020185.
 - Larson R.S., Scott M.A., McCurley T.L., Vnencak-Jones C.L. Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism. *Cancer Res.* 1996; 56(19):4378-81.
 - Duval A., Rolland S., Compoint A., Tubacher E., Iacopetta B., Thomas G. et al. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10(5):513-8. doi: 10.1093/hmg/10.5.513.
 - Miyashita K., Fujii K., Yamada Y., Hattori H., Taguchi K., Yamanaka T. et al. Frequent microsatellite instability in non-Hodgkin lymphomas irresponsive to chemotherapy. *Leuk. Res.* 2008; 32(8):1183-95. doi: 10.1016/j.leukres.2007.11.024.
 - Tian T., Li J., Xue T., Yu B., Li X., Zhou X. Microsatellite instability and its associations with the clinicopathologic characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med.* 2020; 9(7):2330-2342. doi:10.1002/cam4.2870.
 - Starostik P., Greiner A., Schwarz S., Patzner J., Schultz A., Müller-Hermelink H.K. The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development. *Am. J. Pathol.* 2000; 157(4):1129-1136. doi:10.1016/S0002-9440(10)64628-7.
 - Daunay A., Duval A., Baudrin L.G., Buhard O., Renault V., Deleuze J.F. et al. Low temperature isothermal amplification of microsatellites drastically reduces stutter artifact formation and improves microsatellite instability detection in cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(21):e141. doi: 10.1093/nar/gkz811.
 - Lee D., Iallicco M., Akkinpalli H., Morreale G., Liu Y., Leung H. et al. Genotyping SSR length variants by isothermal DNA amplification. *Genome*. 2012; 55(9):691-5. doi: 10.1139/G2012-058.
 - Novo M., Castellino A., Nicolosi M., Santambrogio E., Vassallo F., Chiappella A. et al. High-grade B-cell lymphoma: how to diagnose and treat. *Expert Rev. Hematol.* 2019; 12(7):497-506. doi: 10.1080/17474086.2019.1624157.
 - Hilton L.K., Tang J., Ben-Neriah S., Alcaide M., Jiang A., Grande B.M. et al. The double-hit signature identifies double-hit diffuse large B-cell lymphoma with genetic events cryptic to FISH. *Blood*. 2019; 134(18):1528-1532. doi: 10.1182/blood.2019002600.

Поступила 27.11.20

Принята к печати 18.12.20