

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-41-52>

Валидация тест-системы на основе высокопроизводительного секвенирования для детектирования микросателлитной нестабильности в образцах колоректального рака

А.А. Лебедева^{1,2}, А.Н. Тараскина¹, А.И. Кавун¹, Е.В. Белова^{1,2}, Т.В. Григорьева^{1,2}, О.А. Кузнецова^{1,3}, Д.А. Кравчук⁴, Л.Д. Беляева², В.Э. Никулин³, Е.Д. Хоменко¹, В.А. Милейко^{1,2}, А.А. Трякин³, М.Ю. Федянин³⁻⁵, М.В. Иванов^{1,2}

¹ООО «ОнкоАтлас»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-кт, 4, стр. 1А;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴ГБУЗ г. Москвы «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 108814 Москва, пос. Сосенское, пос. Коммунарка, Сосенский Стан, 8, стр. 3;

⁵ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 105203 Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70

Контакты: Александра Артемовна Лебедева lebedeva_a_a_1@staff.sechenov.ru

Введение. На сегодняшний день в рутинной клинической практике для определения микросателлитной нестабильности (MSI) и дефицита репарации ошибочно спаренных оснований (dMMR) используют стандартные методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) или иммуногистохимического исследования. Выявление MSI с помощью метода высокопроизводительного секвенирования (секвенирования нового поколения – next generation sequencing, NGS) представляет особый интерес в связи с возможностью анализа большого количества микросателлитов, а также одновременного исследования альтераций в терапевтически значимых генах.

Цель исследования – валидация ампликонной NGS-панели для анализа MSI и альтераций в генах, клинически значимых при колоректальном раке.

Материалы и методы. Высокопроизводительное секвенирование для анализа MSI проводилось на фиксированных в формалине и залитых парафином (FFPE) образцах пациентов с колоректальным раком всех стадий с использованием ампликонной панели «Соло-тест Драйвер» (Россия), охватывающей 38 генов и 39 коротких tandemных повторов (моноклеотидов). В качестве референсного метода применяли ПЦР по 5 локусам (BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27). В ходе NGS MSI оценивали на основе распределения к-меров. Статистический анализ проводили с использованием коэффициента каппа Козна (κ), U-критерия Манна–Уитни и точного теста Фишера.

Результаты. Разработана ампликонная NGS-панель для анализа MSI в 39 локусах, а также альтераций в 39 генах, которая провалидирована на 160 архивных FFPE-образцах колоректального рака. По результатам ПЦР 42 (26,25 %) образца оказались MSI-положительными, 118 (73,75 %) – MSI-отрицательными. Результаты ПЦР и NGS были конкордантными в 98,75 % (158/160) случаев.

Заключение. Коэффициент κ составил 0,97, что свидетельствует о высокой конкордантности анализа MSI с помощью ПЦР и разработанной тест-системы на основе NGS.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, секвенирование нового поколения, микросателлитная нестабильность

Для цитирования: Лебедева А.А., Тараскина А.Н., Кавун А.И. и др. Валидация тест-системы на основе высокопроизводительного секвенирования для детектирования микросателлитной нестабильности в образцах колоректального рака. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):41–52.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-41-52>

Validation of high-throughput sequencing-based test system for detection of microsatellite instability in colorectal cancer samples

A.A. Lebedeva^{1,2}, A.N. Taraskina¹, A.I. Kavun¹, E.V. Belova^{1,2}, T.V. Grigor'eva^{1,2}, O.A. Kuznetsova^{1,3}, D.A. Kravchuk⁴, L.D. Belyaeva², V.E. Nikulin³, E.D. Khomenko¹, V.A. Mileyko^{1,2}, A.A. Tryakin³, M.Yu. Fedyanin³⁻⁵, M.V. Ivanov^{1,2}

¹ LLC OncoAtlas; Bld. 4, 1A Leninsky Prospekt, Moscow 119049, Russia;

² Sechenov University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

⁴ Moscow Multidisciplinary Clinical Center "Kommunarka", Moscow Healthcare Department; Bld. 3, 8 Sosenskiy Stan, Kommunarka Sosenskoye, Moscow 108814, Russia;

⁵ N.I. Pirogov National Medical and Surgical Center, Ministry of Health of Russia; 70 Nizhnyaya Pervomayskaya St., Moscow 105203, Russia

Contacts: Alexandra Artemovna Lebedeva lebedeva_a_a_1@staff.sechenov.ru

Introduction. Currently in routine clinical practice, standard methods based on polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemical examination are used to determine microsatellite instability (MSI) and deficient mismatch repair system (dMMR). MSI identification using high-throughput sequencing (next generation sequencing, NGS) is of special interest because it allows to analyze a large number of microsatellites and simultaneously study alterations in therapeutically significant genes.

Aim. To validate of amplicon-based NGS panel for analysis of MSI and alterations in clinically significant genes in colorectal cancer.

Materials and methods. High-throughput sequencing for MSI analysis was performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from patients with colorectal cancer of any stage using amplicon-based panel "Solo-test Driver" (Russia) which covers 38 genes and 39 short tandem repeats (mononucleotides). As a reference method, 5-loci (BAT25, BAT26, NR21, NR24 and NR27) PCR was used. In NGS, MSI was evaluated based on kmer distribution. Statistical analysis was performed using Cohen's kappa (κ), Mann-Whitney U test, and Fisher's exact test.

Results. An amplicon-based NGS panel for analysis of MSI in 39 loci and alterations in 39 genes was developed and validated on 160 archival FFPE samples of colorectal cancer. Per PCR, 42 (26.25 %) samples were MSI-positive, 118 (73.75 %) were MSI-negative. The results of PCR and NGS were concordant in 98.75 % (158/160) cases.

Conclusion. The κ coefficient was 0.97 which demonstrates high concordance of MSI analyses using PCR and the developed NGS-based assay system.

Keywords: high-throughput sequencing, next generation sequencing, microsatellite

For citation: Lebedeva A.A., Taraskina A.N., Kavun A.I. et al. Validation of high-throughput sequencing-based test system for detection of microsatellite instability in colorectal cancer samples. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2025;12(1):41–52. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-41-52>

ВВЕДЕНИЕ

Микросателлитная нестабильность (MSI) представляет собой накопление мутаций в микросателлитах — коротких tandemных повторах (STR), состоящих из многочисленных повторяющихся 1–6 нуклеотидных последовательностей. Такие мутации обычно приводят к изменению длины повторов и отражают нарушение работы системы репарации ошибочных спариваний (MMR) [1–4].

Микросателлитная нестабильность является важным предиктивным биомаркером эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа [5]. Препараты, относящиеся к этим ингибиторам, одобрены в России и за рубежом для лечения пациентов с солидными опухолями при условии положительного MSI-статуса.

Рутинным методом оценки MSI является полимеразная цепная реакция (ПЦР), в то время как оценка дефицита репарации ошибочно спаренных оснований (dMMR) проводится с помощью иммуногистохими-

ческого (ИГХ) исследования с 4 антителами. В настоящее время они широко используются в клинических условиях и рекомендованы профессиональными сообществами [6]. Несмотря на широкое применение, относительно дешевизну и простоту применения, рутинные методы имеют и ряд недостатков [7]. В частности, при использовании ИГХ-анализа могут наблюдаться спорные результаты, поскольку не всегда потеря функции одного из белков синдрома Линча (MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6) ведет к развитию MSI. Помимо этого, часты и ложноотрицательные результаты ИГХ-исследования (отсутствие dMMR — pMMR), обусловленные наличием миссенс-вариантов генов MMR, что приводит к экспрессии нефункционирующих белков с сохраненной способностью связываться антителом. Ложноположительные результаты ИГХ-анализа отмечаются в 5–11 % случаев [1, 8].

В свою очередь, ПЦР позволяет оценить нестабильность только определенных микросателлитов: либо BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123 и D17S250

в панели Bethesda, либо пяти поли-А-моонуклеотидных повторов BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 и NR-27 [9, 10]. Использование существующих тест-систем ПЦР связано с рядом ограничений [11]. Так, при низкой клеточности опухоли ($\leq 20\%$) результаты ПЦР могут быть недостоверными [12, 13]. В некоторых случаях в связи с популяционным полиморфизмом анализируемых STR наблюдаются ложноположительные результаты [14]. Таким образом, определение MSI при колоректальном раке (КРР) с использованием ПЦР может быть затруднено. Кроме того, применимость данных панелей в случае других солидных опухолей остается дискуссионной из-за предполагаемых различий в локусах MSI между КРР и другими типами новообразований [15–19].

Высокопроизводительное секвенирование (секвенирование нового поколения, next generation sequencing (NGS)) является относительно новым методом, позволяющим расширить диапазон анализируемых маркеров MSI [6]. Возросший спрос на тестирование MSI и требования высокой точности и органоспецифичности привели к пересмотру стандартов, методов и интерпретации результатов, а также к разработке новых подходов к определению MSI. Одним из наиболее многообещающих среди них считается NGS из-за его преимуществ, включая высокую точность, расширенный спектр анализируемых микросателлитов и одновременную оценку полного спектра клинически значимых маркеров, таких как высокая мутационная нагрузка и альтерации в таргетируемых мишенях [6, 20]. Анализ MSI с помощью NGS особенно перспективен для спектра опухолей неколоректальной нозологии, вероятно, содержащих опухолеспецифичный набор локусов микросателлитов, которые могут быть нестабильны [21, 22]. Кроме того, подходы с использованием данного метода позволяют проводить анализ по жидкостной биопсии, что способствует решению проблемы доступности опухолевого материала, актуальной для своевременного принятия клинического решения и мониторинга ответа на терапию [23, 24].

Цель исследования — валидация тест-системы NGS для детектирования MSI в образцах КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы. Проанализированы архивные фиксированные в формалине и заключенные в парафин (FFPE) образцы пациентов с КРР всех стадий. Проведено исследование MSI с использованием NGS и ПЦР с последующим фрагментным анализом.

Полимеразная цепная реакция с последующим фрагментным анализом. В качестве «золотого стандарта» определения MSI выбрана ПЦР с последующим фрагментным анализом с использованием панели, позволяющей анализировать 5 локусов: BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27. Наличие MSI определяли во всех образцах.

Интерпретацию результатов проводили согласно международным клиническим руководствам [6].

Всего с помощью разработанной тест-системы на основе NGS и референсного метода ПЦР проанализированы 168 FFPE-образцов, полученных от пациентов с КРР. В 56,9 % случаев локализация опухоли была левосторонней. Не прошли контроль качества и были исключены из дальнейшего анализа 8 проанализированных образцов.

Клинико-морфологическая характеристика пациентов, образцы которых были проанализированы с использованием высокопроизводительного секвенирования и ПЦР, представлена в табл. 1.

Высокопроизводительное секвенирование. Перед выделением ДНК проведено патоморфологическое исследование каждого образца в целях оценки пригодности материала для молекулярно-генетического исследования и выбора наиболее подходящего блока. Определяли общее количество опухолевых клеток и их распределение в образце, наличие очагов некроза, а также преаналитические нарушения.

ДНК выделена из FFPE-блоков с использованием набора ExtractDNA FFPE (ООО «Номотек», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Контроль качества анализа включал оценку концентраций выделенной ДНК ($\leq 0,5$ нг/мкл) и ДНК-библиотек ($\leq 0,6$ нг/мкл, что соответствует 4 нмоль при средней длине библиотеки 267 н.п.). В случае низкой концентрации ДНК (от 0,5 до 1,5 нг/мкл) количество циклов ПЦР увеличивалось до 21. При низкой концентрации ДНК-библиотеки (от 0,3 до 0,6 нг/мкл) возможность дальнейшего секвенирования определялась в частном порядке (с учетом уровня ДНК, а также процента опухолевых клеток и доли некроза, выявленных в ходе патоморфологического исследования исходного образца). Целевое количество прочтений на образец с низкой концентрацией библиотеки увеличивалось минимум до 2,5 млн, что соответствует среднему покрытию 5000х. Концентрации выделенной ДНК и готовых библиотек определяли с помощью флуориметра Fluo-200 (AllSheng, Китай) с использованием набора для измерения концентрации двухцепочечной ДНК Equalbit 1 $\times$ dsDNA HS Assay Kit (Vazyme, Китай). Секвенирование проводилось на приборах FASTASeq300 и Genolab M (GeneMind, Китай).

Приготовление NGS-библиотек проводилось с обогащением целевых регионов методом амплификации с использованием тест-системы «Соло-тест Драйвер» (ООО «ОнкоАтлас», Россия), позволяющей анализировать альтерации (включая однонуклеотидные замены, небольшие (до 40 н.п.) вставки/делеции, а также варианты числа копий генов) 39 генов (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *ALK*, *ARAF*, *BRAF*, *CYP2D6*, *DPYD*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ERBB4*, *ESR1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *G6PD*, *H3-3A*, *H3C2*, *H3C3*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *POLE*, *PDGFRA*, *PIK3CA*,

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика пациентов, образцы которых проанализированы с использованием высокопроизводительного секвенирования и полимеразной цепной реакции

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients samples of which were analyzed using next-generation sequencing and polymerase chain reaction

Показатель Parameter	Число пациентов, n (%) Number of patients, n (%)
Стадия: Stage:	
I	8 (5)
II	20 (12,5)
III	48 (30)
IV	80 (50)
нет информации no data	4 (2,5)
T-стадия: T-stage:	
T1	4 (2,5)
T2	10 (6,3)
T3	107 (66,9)
T4	35 (21,9)
нет информации no data	4 (2,5)
N-стадия: N-stage:	
N0	36 (22,5)
N1	70 (43,8)
N2	48 (30)
N3	1 (0,6)
Nx или нет информации Nx or no data	5 (3,1)
M-стадия: M-stage:	
M0	74 (46,3)
M1	80 (50)
Mx или нет информации Mx or no data	6 (3,8)
Локализация опухоли: Tumor localization:	
левосторонняя left-sided	91 (56,9)
правосторонняя right-sided	25 (15,6)
прямая кишка rectum	35 (21,9)
прямая кишка и левосторонняя rectum and left-sided	3 (1,9)
нет информации no data	6 (3,8)

PTEN, RAC1, RAF1, RIT1, ROS1, STK11, TP53, UGT1A1). Помимо этого, тест-система обеспечивает анализ последовательности 71 STR, что позволяет проводить анализ MSI. В дальнейшем для оценки MSI отобраны 39 STR на основании данных литературы и публичных репозиториев. Все отобранные STR были мононуклеотидными (табл. 2).

Таблица 2. Список коротких tandemных повторов, отобранных для анализа микросателлитной нестабильности

Table 2. List of short tandem repeats selected for microsatellite instability analysis

Позиция в геноме Genomic coordinates	Единица повтора Repeating unit	Длина повтора (п.н.) Repeat length (b.p.)
chr10:28872498-28872543	A	16
chr12:104077126-104077160	A	16
chr12:110834049-110834072	A	18
chr12:21791426-21791458	A	15
chr12:76763106-76763202	A	13
chr12:85285938-85285982	A	17
chr12:91372059-91372072	A	16
chr13:21370412-21370483	A	13
chr13:28133972-28134054	A	15
chr13:31722638-31722684	A	17
chr14:89087296-89087363	A	17
chr14:92441143-92441174	A	13
chr16:18882675-18882723	A	15
chr16:47399687-47399721	T	16
chr17:19314936-19314973	T	18
chr17:71223438-71223458	A	13
chr2:62063111-62063146	A	17
chr22:29696485-29696505	T	16
chr3:108224701-108224764	A	15
chr6:142691968-142692014	T	17
chr6:157495966-157495975	T	14
chr6:25426658-25426723	T	17
chr6:44216556-44216642	T	11
chr7:1787537-1787618	A	17
chr1:47123914-47123989	A	15
chr8:103287864-103287920	A	13
chr1:234601476-234601541	A	19
chr1:54395692-54395735	A	18
chr11:106695527-106695557	T	12
chr14:51348299-51348333	T	17
chr2:120404644-120404687	T	14
chr7:138434081-138434163	A	14
chr9:133498245-133498307	A	15
chr1:201754428-201754498	T	17
chr11:59368235-59368293	A	16
chr3:196088826-196088882	A	16
chr5:172421776-172421849	T	15
chr6:32147305-32147379	T	13
chr7:105122908-105122967	A	16

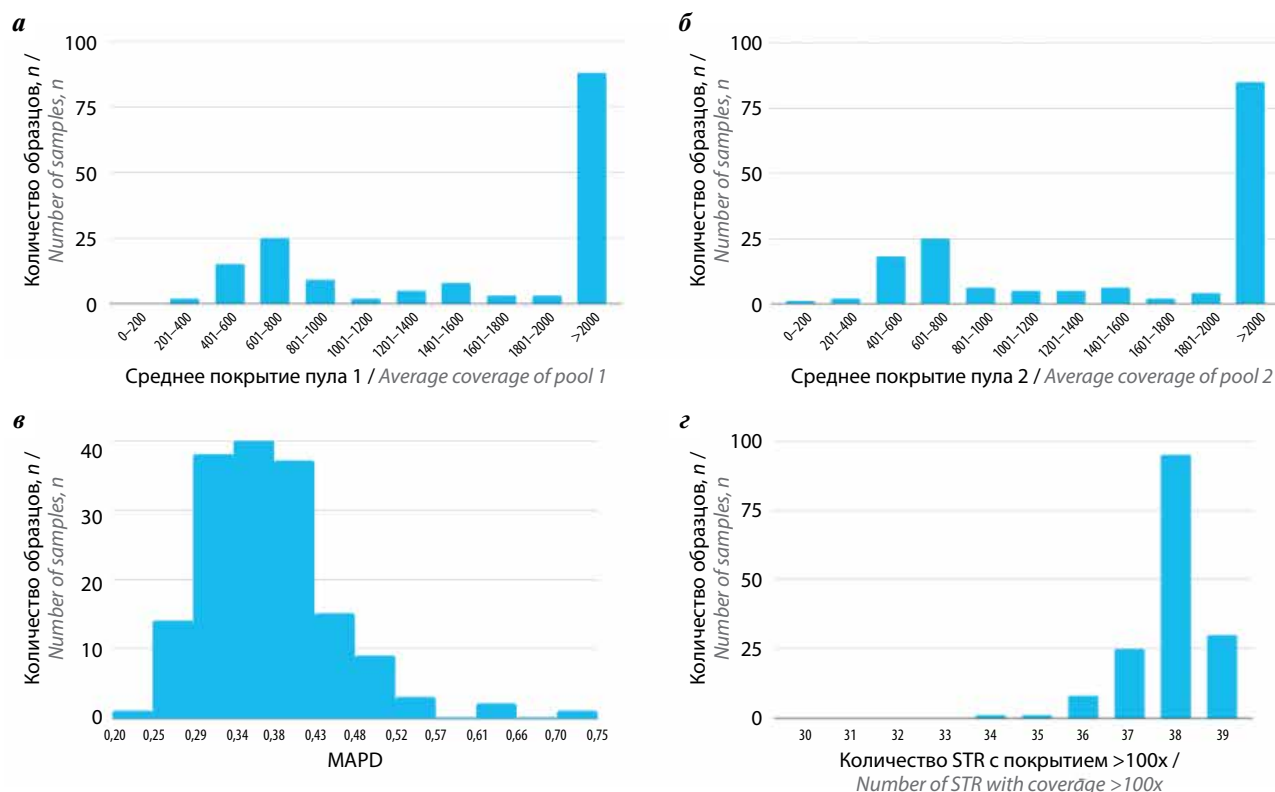


Рис. 1. Качество данных секвенирования 160 архивных образцов пациентов с колоректальным раком, включая среднее покрытие каждого пула (а, б), равномерность (MAPD) (в) и распределение количества коротких tandemных повторов (STR) с покрытием >100x (г)

Fig. 1. Sequencing data quality of 160 archived colorectal cancer patient samples, including (A, B) mean coverage of each pool (a, б), median absolute pairwise difference (MAPD) (в), and distribution of the number of short tandem repeats (STRs) with >100x coverage (г)

Анализ данных секвенирования проводили с помощью программного обеспечения Solo AVES (ООО «ОнкоАтлас», Россия). Биоинформатический контроль качества включал оценку глубины покрытия (среднее покрытие, как и покрытие каждого отдельного пула, $\leq 200\times$), равномерности (median absolute pairwise difference (MAPD) $\leq 1,00$ для каждого отдельного пула), а также покрытие каждого STR (≤ 34 регионов STR с покрытием $\leq 100\times$). Анализ MSI выполняли на основе перепредставленности к-меров, соответствующих укороченным длинам каждого региона STR (короче на 2 н.п. и более по сравнению с референсным значением) с последующим исключением перепредставленных к-меров, которые встречаются в 2 % и более достоверно стабильных образцов (данные секвенирования 100 образцов — референсный набор образцов — с подтвержденным MSI-отрицательным статусом, использованных для разработки метода анализа). Затем проводили суммирование перепредставленности (в долях от общего количества к-меров для конкретного STR) по всем STR. Итоговая сумма была определена как MSI-скор. При превышении MSI-скором порогового значения (определенного по значениям MSI-скорам референсного набора образцов как среднее значение + 5 стандартных отклонений) образец интерпретировали как MSI, в ином случае образец

интерпретировали как микросателлитную стабильность (MSS).

В качестве метода сравнения оценки MSI использовался алгоритм MSI Sensor Pro [25]. Он оценивает MSI как процент нестабильных микросателлитов в образце. Для этого используется модель мультиномиального распределения, позволяющая определить вероятность проскальзывания полимеразы с учетом распределения длин повторов, наблюдаемого в непарных стабильных образцах.

Статистический анализ. Для анализа конкордантности результатов ПЦР и NGS использовали коэффициенты каппа Коэна (κ). Разницу между MSS- и MSI-образцами исследовали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни и точного теста Фишера. При $p < 0,05$ разница считалась статистически значимой.

Мутационную нагрузку (TMB) рассчитывали как количество мутаций на 1 Мб. При подсчете не учитывали активирующие мутации, а также мутации с частотой $< 10\%$ максимальной частоты активирующих мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* и *TP53* или $< 2,5\%$ максимальной частоты активирующих мутаций в остальных генах. Для значения TMB рассчитывали 95 % доверительный интервал с помощью биномиального распределения. Сравнение групп MSI/MSS проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конкордантность NGS и ПЦР в отношении детектирования микросателлитной нестабильности. Средняя концентрация ДНК для всех образцов составила 30,8 нг/мкл (медиана 7,1 (0,76–3181) нг/мкл), средняя концентрация библиотеки – 20,6 нг/мкл (медиана 22,7 (0,39–44,8) нг/мкл). Доля опухолевых клеток в материале, исследованном методом ПЦР, составила 10–80 %, в материале, проанализированном с помощью NGS, – 5–80 %. Медиана среднего покрытия всех образцов оказалась равной 2352х (диапазон 238–28447х), MAPD – 0,368 (диапазон 0,236–0,731). В 58,7 % образцов 38 из 39 проанализированных STR имели покрытие, превышающее 100х. При этом минимальное количество STR с таким покрытием составило 33 (рис. 1).

Все образцы, успешно прошедшие контроль качества, протестированы на наличие MSI с использо-

ванием разработанной NGS-тест-системы и ПЦР в качестве референсного метода. По результатам ПЦР 42 (26,25 %) образца оказались MSI-положительными, 118 (73,75 %) – MSI-отрицательными. По результатам NGS в 40 (25 %) образцах выявлена MSI, 120 (75 %) были MSI-отрицательными (табл. 3). Результаты ПЦР и NGS оказались конкордантными в 98,75 % (158/160) случаев. Таким образом, коэффициент конкордантности к составил 0,97. Специфичность разработанной тест-системы в определении MSI достигла 100 % (96,92–100 %), прогностическая ценность положительного результата MSI (PPV) – 100 % (91,19–100 %) (табл. 4).

Расширенные результаты NGS. В ходе NGS-исследования получена информация о наличии генетических вариантов и вариантов числа копий в проанализированных генах (рис. 2). В 149 (93,1 %) образцах обнаружен как минимум 1 генетический вариант.

Таблица 3. Соответствие результатов высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) (n = 160)

Table 3. Concordance next generation sequencing (NGS) and polymerase chain reaction (PCR) results. A total of 160 samples were analyzed using both methods (n = 160)

Показатель Parameter	ПЦР MSI, n (%) PCR MSI, n (%)	ПЦР MSS, n (%) PCR MSS, n (%)
NGS MSI	40 (25)	0
NGS MSS	2 (1,25)	118 (73,75)

Примечание. MSI – микросателлитная нестабильность; MSS – микросателлитная стабильность.

Note. MSI – microsatellite instability; MSS – microsatellite stability.

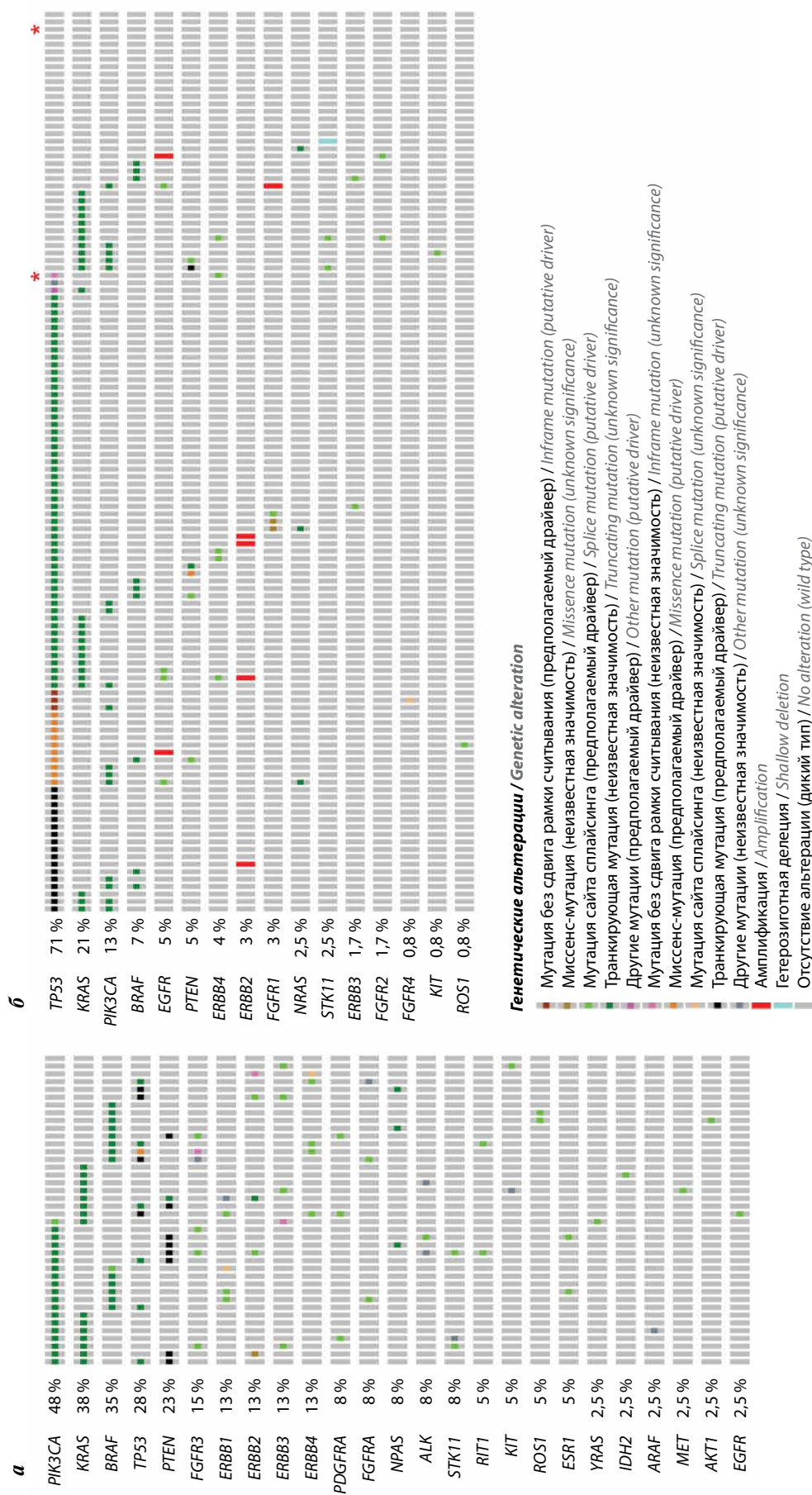
Таблица 4. Аналитические характеристики NGS-тест-системы

Table 4. Analytical characteristics of the NGS test system

Показатель Parameter	Значение Value
Чувствительность (95 % ДИ) Sensitivity (95 % CI)	95,24 % (83,84–99,42 %)
Специфичность (95 % ДИ) Specificity (95 % CI)	100 % (96,92–100 %)
PPA (95 % ДИ) PPA (95 % CI)	100 % (91,19–100 %)
NPA (95 % ДИ) NPA (95 % CI)	98,33 % (93,85–99,56 %)
Точность (95 % ДИ) Accuracy (95 % CI)	98,75 % (95,56–99,85 %)
Конкордантность (κ) Concordance (κ)	0,97

Примечание. ДИ – доверительный интервал; NGS – высокопроизводительное секвенирование (секвенирование нового поколения); PPA – положительное согласие; NPA – отрицательное согласие.

Note. CI – confidence interval; NGS – next generation sequencing; PPA – positive percent agreement; NPA – negative percent agreement.



*Образцы, для которых получены дискордантные результаты полимеразной цепной реакции и NGS (ложноотрицательные образцы) /
 *Samples for which discordant polymerase chain reaction and NGS results were obtained (false negative samples)

Рис. 2. Встречаемость альтераций в различных генах в образцах, определенных как MSI-положительные (MSI – микросателлитная нестабильность) (а) и MSI-отрицательные (б) по результатам высокопроизводительного секвенирования (секвенирование нового поколения) (next-generation sequencing, NGS)

Fig. 2. Frequency of alterations in different genes in samples defined as MSI-positive (MSI – microsatellite instability) (а) or MSI-negative (б) based on next-generation sequencing (NGS) analysis

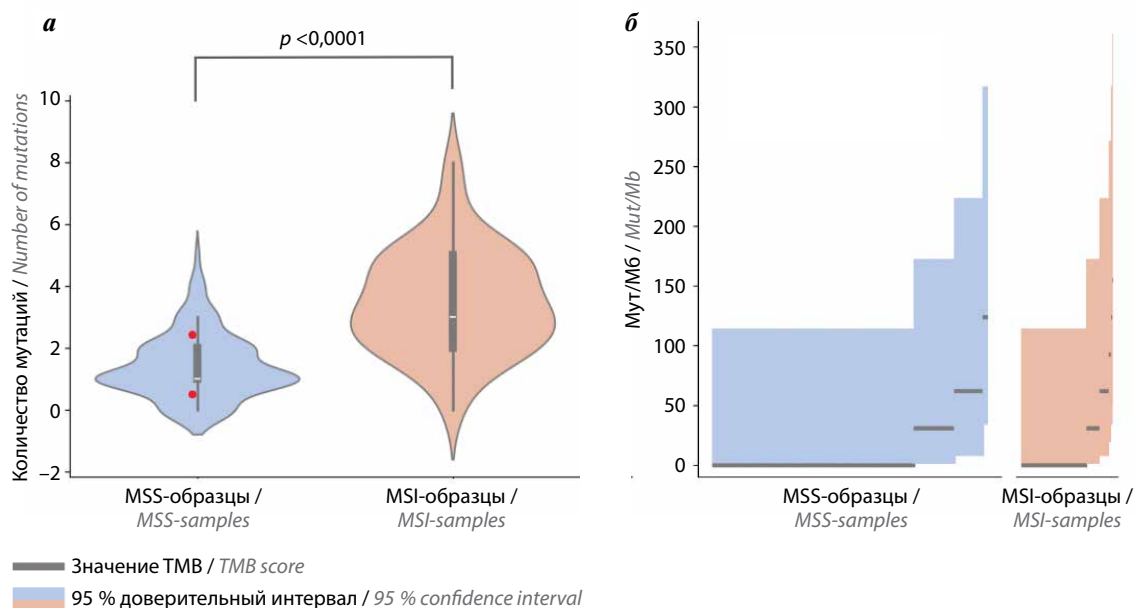


Рис. 3. Количество мутаций (а) и мутационная нагрузка (TMB) (б) в MSI- и MSS-образцах. Красными точками указано количество мутаций в образцах, MSI-статус которых различался по результатам высокопроизводительного секвенирования и полимеразной цепной реакции. MSI – микросателлитная нестабильность; MSS – микросателлитная стабильность

Fig. 3. Number of mutations (a) and tumor mutational burden (TMB) (b) observed in MSI or MSS samples. Red dots show the number of mutations in samples with discordant MSI status according to next-generation sequencing and polymerase chain reaction. MSI – microsatellite instability; MSS – microsatellite stability

В 19 (11,9 %) образцах выявлен вариант *BRAF*^{p.V600E}, 13 из них оказались MSI-положительными на основании результатов как NGS, так и ПЦР. Количество мутаций в MSI-положительных образцах пациентов было значительно выше, чем в MSI-отрицательных (медиана 3 против 1; $p < 0,0001$). Максимальное количество мутаций в MSI-образцах составило 8, в MSS-образцах – 5 (рис. 3, а). Мутационная нагрузка в MSI-положительных образцах была статистически значимо выше, чем в MSI-отрицательных (медиана 61,9 мут/Мб против 0 мут/Мб; $p < 0,05$) (рис. 3, б).

Симуляция смешивания образцов. Для оценки робастности методологии оценки MSI с использованием разработанной NGS-тест-системы, а также оценки аналитической чувствительности (определения минимальной доли опухолевых клеток в образце, при которой достоверно детектируется MSI) проведено *in silico* смешивание данных секвенирования для достижения ожидаемой доли опухолевого образца. Для этого выбраны 11 пациентов с MSI-опухолями, по которым имелись данные секвенирования опухолевого материала и секвенирования другого вида биологического материала (не-FFPE).

In silico эксперимент проводился путем случайной выборки чтений из данных секвенирования опухолевого материала и их прямого смешения со случайной выборкой чтений из данных секвенирования материала не-FFPE. Смешение выполнялось с расчетом, что отношение чтений из данных секвенирования опухолевого материала к общему количеству чтений в образце *in silico* должно соответствовать заданной

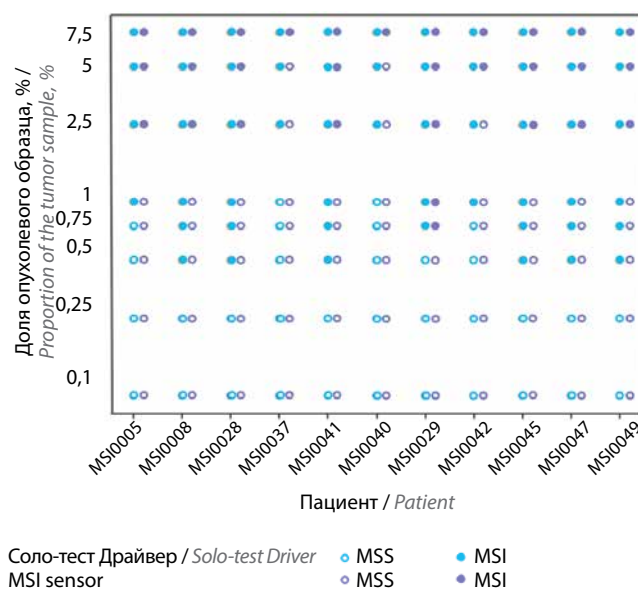


Рис. 4. Результаты сравнения аналитической чувствительности тест-системы по данным *in silico* смешивания MSI- и MSS-образцов и по данным, полученным с помощью алгоритма MSI Sensor. Эксперимент проводили с использованием 22 образцов, полученных от 11 пациентов с ранее верифицированным по опухолевому образцу MSI-статусом. Для всех образцов определен MSI-статус по каждой представленной доли опухолевых клеток. MSI – микросателлитная нестабильность; MSS – микросателлитная стабильность

Fig. 4. Analysis of the analytical sensitivity of the test system based on *in silico* data of mixing MSI and MSS samples and comparison with the MSI Sensor algorithm. The experiment was conducted using 22 samples from 11 patients with MSI status verified by the tumor sample. For each sample, the MSI status was determined for each represented proportion of tumor cells. MSI – microsatellite instability; MSS – microsatellite stability

заранее доле опухолевого материала в итоговом образце (диапазон доли опухолевого материала — от 0—1 до 7 %). Минимальная доля опухолевого образца, при которой определялась MSI как минимум в одном образце, составила 0,5 %: при этой доле опухолевого образца 6 (54,6 %) образцов определены как MSI-положительные. При доле опухолевого образца 0,75 % в 7 (63,4 %) образцах выявлена MSI, при доле 1 % — в 9 (81,8 %). Начиная с доли опухолевого образца в 2,5 %, MSI достоверно определялась в 100 % образцов (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

С развитием прецизионной онкологии все большее количество мишеней требует рутинного анализа в клинической практике. NGS является перспективным методом для одновременного анализа множества нарушений, включая MSI.

В настоящее время анализ MSI с использованием NGS не является стандартом в российской клинической практике. В то же время различные широко валидированные NGS-тест-системы и стандартные методы выявления dMMR/MSI демонстрируют высокую конкордантность. Так, активно применяемая гибридизационная NGS-панель FoundationOne CDx (Foundation Medicine, США) продемонстрировала 97 % конкордантность при сравнении с ИГХ-исследованием и ПЦР при анализе различных солидных опухолей: в 65 из 67 образцов наблюдалась сходимость методов [26]. Другая панель — NovoPM-MSI (Novogene, Китай) — показала 97,1 % конкордантность при сравнении со стандартными методами в ходе анализа 113 образцов, полученных от пациентов с KPP [27]. Еще одна гибридизационная панель — TruSight Oncology 500 (Illumina, США) — продемонстрировала 100 % конкордантность при сравнении с ПЦР при различных солидных опухолях, однако выборка была ограниченной и включала только 6 MSI-образцов [28]. Для небольших ампликонных панелей, разработанных в исследовательских целях, и ПЦР также характерна высокая конкордантность. Так, в работах K. Zheng и соавт. и C. Gan и соавт. при анализе образцов KPP конкордантность этих методов составила 100 % [29, 30]. В исследовании Y. Hirotsu и соавт. чувствительность NGS-панели при сравнении с ПЦР и ИГХ-методом оказалась равной 100 %, специфичность — 91,3 %, однако оценивались различные нозологии [31]. Таким образом, при анализе MSI конкордантность разработанной NGS-тест-системы и ПЦР сопоставима с конкордантностью широко применяемых для молекулярного профилирования опухолей NGS-панелей и ПЦР. Чувствительность панели «Соло-тест Драйвер» составила 95,24 (83,84—99,42) %, специфичность — 100 (96,92—100) %, конкордантность (κ) — 0,97.

Для 2 образцов получены дискордантные результаты: по данным NGS выявлена MSS, по данным ПЦР — MSI. В одном образце ложноотрицательные результаты NGS, вероятно, связаны с наличием ДНК из очагов

некроза, которая могла попасть в проанализированную ДНК. Причиной этого также может быть низкая клеточность, что подтверждается фактом невысокой частоты встречаемости альтернативного аллеля обнаруженной драйверной мутации (в образце выявлен вариант *TP53* p.Thr125Met с частотой альтернативного аллеля 1,5 %), что не характерно при анализе FFPE-материала. Так, в 95 % (38/40) MSI-образцов определены драйверные варианты с частотой более 5 %, в противовес MSS-образцам, в которых только в 79,2 % (95/120) случаев обнаружены драйверные варианты с такой частотой ($p = 0,0467$). В другом ложноотрицательном образце не выявлено ни одной соматической мутации, что не характерно для MSI-опухолей. Так, мутации в целевой последовательности не были обнаружены в 15,8 % (19/120) MSS-опухолей и 2,5 % (1/40) MSI-опухолей ($p = 0,0485$). Эти результаты могут свидетельствовать о низком качестве проанализированного материала или об отсутствии опухолевых клеток в анализируемом материале. Таким образом, все ложноотрицательные случаи могут быть объяснены этим.

Применение тест-систем на основе NGS позволяет одновременно анализировать различные альтерации в опухоли, значительно сокращая временные затраты и расход опухолевого материала. В результате нарушения работы системы MMR в опухоли накапливаются мутации, что может повысить мутационную нагрузку [6, 32, 33]. В проанализированной выборке количество мутаций, выявленных в MSI-образцах, было статистически значимо выше, чем в MSS-образцах (см. рис. 3). В 38 % MSI-опухолей обнаружены альтерации, анализ которых предписан клиническими руководствами для планирования системной терапии. В частности, в 35 % MSI-образцов выявлен вариант *BRAF*^{V600E}. Это может свидетельствовать о том, что MSI в этих образцах — результат гиперметилирования промотора *MLH1* [34, 35]. В то же время в 21 % MSS-образцов также обнаружены альтерации, анализ которых является стандартом диагностики KPP.

Одним из преимуществ оценки MSI методом NGS по сравнению со стандартными методами (ИГХ-исследованием и ПЦР) является возможность использования материала с низким содержанием опухолевых клеток, а также жидкостной биопсии. Применение NGS в отличие от стандартных методов позволяет исследовать длину большого количества STR и автоматически анализировать распределение длин повторов, что помогает исключить фактор некорректной интерпретации результатов. Полученные результаты симуляции смешивания образцов *in silico* продемонстрировали 100 % чувствительность разработанной тест-системы в отношении детектирования MSI уже при 2,5 % опухолевого материала в образце, что свидетельствует о перспективности применения тест-системы на основе NGS для анализа материала с низким содержанием опухолевых клеток. При этом при сравнении с широко используемым алгоритмом для анализа MSI продемонстрирована более высокая чувстви-

тельность тест-системы «Соло-тест Драйвер», что показывает возможность высокоточного детектирования MSI при небольшом количестве опухолевого материала или при использовании жидкостной биопсии, что является актуальным вопросом молекулярно-генетической диагностики KPP.

Ограничением данного исследования являлась относительно небольшая выборка образцов. Кроме того, для валидации панели в рамках настоящей работы использованы образцы только KPP.

Таким образом, разработанная NGS-тест-система имеет преимущества перед стандартными методами и позволяет с высокими чувствительностью, точностью и специфичностью детектировать MSI, а также

проводить одновременный анализ клинически значимых альтераций, характерных для KPP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о высокой конкордантности ПЦР и разработанной NGS-тест-системы «Соло-тест Драйвер» в отношении анализа MSI. Количество мутаций в MSI-положительных образцах было значительно выше, чем в MSI-отрицательных образцах, что демонстрирует корректность полученных данных. Результаты симуляции смешивания образцов *in silico* демонстрируют, что разработанная NGS-тест-система позволяет проводить анализ MSI в образцах с низким содержанием опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Barette M., Le D.T. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther* 2018;189:45–62. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.04.004
2. Ma J., Setton J., Lee N.Y. et al. The therapeutic significance of mutational signatures from DNA repair deficiency in cancer. *Nat Commun* 2018;9(1):3292. DOI: 10.1038/s41467-018-05228-y
3. Lepore Signorile M., Disciglio V., Di Carlo G. et al. From genetics to histomolecular characterization: an insight into colorectal carcinogenesis in Lynch syndrome. *Int J Mol Sci* 2021;22(13):6767. DOI: 10.3390/ijms22136767
4. Lower S.S., McGurk M.P., Clark A.G. et al. Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. *Curr Opin Genet Dev* 2018;49:70–8. DOI: 10.1016/j.gde.2018.03.003
5. Kavun A., Veselovsky E., Lebedeva A. et al. Microsatellite instability: a review of molecular epidemiology and implications for immune checkpoint inhibitor therapy. *Cancers* 2023;15(8):2288. DOI: 10.3390/cancers15082288
6. Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol* 2019;30(8):1232–43. DOI: 10.1093/annonc/mdz116
7. Yakushina V., Kavun A., Veselovsky E. et al. Microsatellite Instability detection: the current standards, limitations, and misinterpretations. *JCO Precis Oncol* 2023;7:e2300010. DOI: 10.1200/po.23.00010
8. Amato M., Franco R., Facchini G. et al. Microsatellite instability: from the implementation of the detection to a prognostic and predictive role in cancers. *Int J Mol Sci* 2022;23(15):8726. DOI: 10.3390/ijms23158726
9. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(4):261–8. DOI: 10.1093/jnci/djh034
10. Goel A., Nagasaka T., Hamelin R. et al. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One* 2010;5(2):e9393. DOI: 10.1371/journal.pone.0009393
11. Coelho H., Jones-Hughes T., Snowsill T. et al. A systematic review of test accuracy studies evaluating molecular micro-satellite instability testing for the detection of individuals with Lynch syndrome. *BMC Cancer* 2017;17(1):836. DOI: 10.1186/s12885-017-3820-5
12. Parente P., Grillo F., Vanoli A. et al. The day-to-day practice of MMR and MSI assessment in colorectal adenocarcinoma: what we know and what we still need to explore. *Dig Dis* 2023;41(5):746–56. DOI: 10.1159/000531003
13. Ukkola I., Nummela P., Kero M., Ristimäki A. Diagnostic performance of Idylla MSI test in colorectal cancer biopsies. *Diagn Pathol* 2023;18(1):39. DOI: 10.1186/s13000-023-01328-6
14. Cohen R., Hain E., Buhard O. et al. Association of primary resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancer with misdiagnosis of microsatellite instability or mismatch repair deficiency status. *JAMA Oncol* 2019;5(4):551–5. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.4942
15. Shia J. The diversity of tumours with microsatellite instability: molecular mechanisms and impact upon microsatellite instability testing and mismatch repair protein immunohistochemistry. *Histopathology* 2020;78(4):485–97. DOI: 10.1111/his.14271
16. Cortes-Ciriano I., Lee S., Park W.Y. et al. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun* 2017;8(1):15180. DOI: 10.1038/ncomms15180
17. Yang R.K., Chen H., Roy-Chowdhuri S. et al. Clinical testing for mismatch repair in neoplasms using multiple laboratory methods. *Cancers* 2022;14(19):4550. DOI: 10.3390/cancers14194550
18. Kim T.M., Laird P.W., Park P.J. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell* 2013;155(4):858–68. DOI: 10.1016/j.cell.2013.10.015
19. Kuusmanen S.A., Moisio A.L., Schweizer P. et al. Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability. *Am J Pathol* 2002;160(6):1953–8. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)61144-3
20. Gilson P., Merlin J.L., Harlé A. Detection of microsatellite instability: state of the art and future applications in circulating tumour DNA (ctDNA). *Cancers* 2021;13(7):1491. DOI: 10.3390/cancers13071491
21. Ratovomanana T., Cohen R., Svrcek M. et al. Performance of next-generation sequencing for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer with deficient DNA mismatch repair. *Gastroenterology* 2021;161(3):814–26.e7. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.05.007
22. Lebedeva A., Belova E., Grigoreva T. et al. MSI detection by NGS using tumor samples and liquid biopsy for patients with solid tumors: a single institution experience. *Ann Oncol* 2023;34(1):1–55. DOI: 10.1016/esmoop/esmoop101646
23. Cisneros-Villanueva M., Hidalgo-Pérez L., Rios-Romero M. et al. Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review. *Br J Cancer* 2022;126(3):391–400. DOI: 10.1038/s41416-021-01696-0

24. Yu F., Makrigiorgos A., Leong K.W. et al. Sensitive detection of microsatellite instability in tissues and liquid biopsies: recent developments and updates. *Comput Struct Biotechnol J* 2021;19:4931–40. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.08.037
25. Jia P., Yang X., Guo L. et al. MSIsensor-pro: fast, accurate, and matched-normal-sample-free detection of microsatellite instability. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2020;18(1):65–71. DOI: 10.1016/j.gpb.2020.02.001
26. Trabucco S.E., Gowen K., Maund S.L. 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
27. Zhao L., Shan G., Li L. et al. A robust method for the rapid detection of microsatellite instability in colorectal cancer. *Oncol Letters* 2020;20(2):1982–8. DOI: 10.3892/ol.2020.11702
28. Froyen G., Geerdens E., Berden S. et al. Diagnostic validation of a comprehensive targeted panel for broad mutational and biomarker analysis in solid tumors. *Cancers* 2022;14(10):2457. DOI: 10.3390/cancers14102457
29. Zheng K., Wan H., Zhang J. et al. A novel NGS-based microsatellite instability (MSI) status classifier with 9 loci for colorectal cancer patients. *J Transl Med* 2020;18(1):215. DOI: 10.1186/s12967-020-02373-1
30. Gan C., Love C., Beshay V. et al. Applicability of next generation sequencing technology in microsatellite instability testing. *Genes* 2015;6(1):46–59. DOI: 10.3390/genes6010046
31. Hirotsu Y., Nagakubo Y., Amemiya K. et al. Microsatellite instability status is determined by targeted sequencing with MSICall in 25 cancer types. *Clinica Chimica Acta* 2020;502:207–13. DOI: 10.1016/j.cca.2019.11.002
32. Yuza K., Nagahashi M., Watanabe S. et al. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget* 2017;8(67):112103–15. DOI: 10.18632/oncotarget.22783
33. Goodman A.M., Sokol E.S., Frampton G.M. et al. Microsatellite-stable tumors with high mutational burden benefit from immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2019;7(10):1570–3. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-19-0149
34. McGivern A., Wynter C.V.A., Whitehall V.L.J. et al. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Familial Cancer* 2002;3(2):101–7. DOI: 10.1023/b:fame.0000039861.30651.c8
35. Bond C.E., Liu C., Kawamata F. et al. Oncogenic BRAF mutation induces DNA methylation changes in a murine model for human serrated colorectal neoplasia. *Epigenetics* 2018;13(1):40–8. DOI: 10.1080/15592294.2017.1411446

Вклад авторов

А.А. Лебедева: анализ данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи, редактирование;
 А.Н. Тараскина: анализ данных, редактирование;
 А.И. Кавун: написание текста статьи, редактирование;
 Е.В. Белова: систематизация данных, редактирование;
 Т.В. Григорьева, Л.Д. Беляева: подготовка материала, написание текста статьи, редактирование;
 О.А. Кузнецова, Д.А. Кравчук, В.Э. Никулин: сбор материала, редактирование;
 Е.Д. Хоменко: проведение эксперимента, редактирование;
 В.А. Милейко: курирование проекта, редактирование;
 А.А. Трякин, М.Ю. Федянин: сбор материала, курирование проекта, редактирование;
 М.В. Иванов: разработка концепции исследования, научное руководство, анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

A.A. Lebedeva: data analysis, preparation of illustrative material, article writing, editing;
 A.N. Taraskina: data analysis, editing;
 A.I. Kavun: article writing, editing;
 E.V. Belova: data systematization, editing;
 T.V. Grigor'eva, L.D. Belyaeva: preparing the material, article writing, editing;
 O.A. Kuznetsova, D.A. Kravchuk, V.E. Nikulin: collecting material, editing;
 E.D. Khomenko: conducting an experiment, editing;
 V.A. Mileyko: project supervision, editing;
 A.A. Tryakin, M.Yu. Fedyanin: collecting material, curating the project, editing;
 M.V. Ivanov: development of the research concept, scientific guidance, data analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Лебедева / A.A. Lebedeva: <https://orcid.org/0000-0003-1920-5076>
 А.Н. Тараскина / A.N. Taraskina: <https://orcid.org/0000-0003-1952-9783>
 А.И. Кавун / A.I. Kavun: <https://orcid.org/0000-0003-3861-5281>
 Е.В. Белова / E.V. Belova: <https://orcid.org/0000-0002-7701-8765>
 Т.В. Григорьева / T.V. Grigor'eva: <https://orcid.org/0000-0001-9054-1481>
 О.А. Кузнецова / O.A. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0001-7753-3081>
 Д.А. Кравчук / D.A. Kravchuk: <https://orcid.org/0000-0002-8780-6159>
 Л.Д. Беляева / L.D. Belyaeva: <https://orcid.org/0009-0007-7177-2875>
 В.Э. Никулин / V.E. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-8958-9805>
 Е.Д. Хоменко / E.D. Khomenko: <https://orcid.org/0009-0008-7852-7466>
 В.А. Милейко / V.A. Mileyko: <https://orcid.org/0000-0002-0272-1747>
 А.А. Трякин / A.A. Tryakin: <https://orcid.org/0000-0003-2245-214X>
 М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
 М.В. Иванов / M.V. Ivanov: <https://orcid.org/0000-0002-9961-0129>

Конфликт интересов. А.А. Лебедева, А.Н. Тараскина, А.И. Кавун, Е.В. Белова, Т.В. Григорьева, О.А. Кузнецова, Е.Д. Хоменко, В.А. Милейко, М.В. Иванов являются сотрудниками ООО «ОнкоАтлас». Другие авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. A.A. Lebedeva, A.N. Taraskina, A.I. Kavun, E.V. Belova, T.V. Grigor'eva, O.A. Kuznetsova, E.D. Khomenko, V.A. Mileyko, M.V. Ivanov are employees of LLC "OncoAtlas". The other authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 22-75-10154).
Funding. The research was supported by a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 22-75-10154).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of Sechenov University, Ministry of Health of Russia.