МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ (обзор литературы)

Цуканов А.С., Шелыгин Ю.А., Шубин В.П.

ФГБУ «ГНЦК им.А.Н. Рыжих» Минздрава России, г. Москва
(директор – чл.-корр. РАН, профессор Ю.А. Шелыгин)

[Ключевые слова: колоректальный рак, микросателлитная нестабильность, синдром Линча, ген BRAF]

MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL CANCER (review)

Tsukanov A.S., Shelygin Yu.A., Achkasov S.I., Shubin V.P., Kashnikov V.N.
State Scientific Centre of Coloproctology, Moscow, Russia

[Keywords: colorectal cancer, microsatellite instability, Lynch syndrome, BRAF gene]

*Адрес для переписки: Цуканов Алексей Сергеевич, ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России,
ул. Саляма Адила, д. 2, Москва, 123423, e-mail: info@gnck.ru*

В настоящее время определение микросателлитной нестабильности (МСН) при колоректальном раке становится все более актуальным. Это исследование способствует эффективному скринингу пациентов с синдромом Линча, а также позволяет решить вопрос о целесообразности назначения химиотерапии у больных со второй стадией рака толстой кишки. Кроме того, анализ МСН помогает уточнить прогноз заболевания у пациентов, в чьих опухолях выявляется соматическая мутация в гене *BRAF*. Все эти аспекты будут рассмотрены в данной статье.

Микросателлиты – участки ДНК, состоящие из многократно повторяющегося элемента. В качестве таких элементов выступают от одного до шести нуклеотидов (Рис. 1). Микросателлиты более-менее равномерно распределены по геному человека, и в большинстве случаев не несут никакой смысловой нагрузки, в связи с чем и получили свое название.

В 1993 году 3 независимыми группами исследователей при изучении ДНК колоректального рака было показано, что в существенной части опухолей обнаруживается феномен МСН, т. е. изменение числа повторяющихся нуклеотидов в сравнении с их количеством в ДНК из нормальной ткани [12,20,25]. В большинстве случаев в опухолевой

ткани обнаруживалось меньшее количество повторяющихся нуклеотидов (Рис. 1).

В настоящее время известно, что МСН выявляется более чем в 95% опухолей, которые обусловлены синдромом Линча. Кроме того, МСН определяется в 12% случаев спорадического рака толстой кишки [33]. При этом причиной возникновения МСН в опухоли в любом случае является инактивация генов системы репарации ДНК (mismatch repair system), которая может быть обусловлена как наследственной причиной, так и соматической.

К белкам системы репарации ДНК относятся MSH2, MSH6, MLH1 и PMS2. Первые 2 белка в этой системе отвечают за поиск ошибочно спаренных оснований. Эти ошибки возникают во время синтеза ферментом полимеразой цепи ДНК. В том случае, когда комплекс белков MSH2-MSH6 обнаруживает ошибку, к нему присоединяется гетеродимер, включающий белки MLH1 и PMS2. В дальнейшем к комплексу, состоящему уже из 4 белков, «подходит» экзонуклеаза, которая и расщепляет участок ДНК, содержащий ошибку. После этого полимеразой достраивается цепь ДНК правильно спаренными нуклеотидами [11].

Как указывалось выше, инактивация генов системы репарации ДНК может быть обусловлена наследственной причиной, а именно – герминальной

Участок ДНК в клетках нормальной ткани---TGAGCGCGCGCGCGCGCGAGCT---

Участок ДНК в клетках опухолевой ткани---TGAGCGCGCGCGCGCGAGCT---

Рисунок 1. Микросателлитная нестабильность представляет собой изменение количества повторяющихся нуклеотидов в ДНК опухолевых клеток

мутацией в одном из генов *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* или *PMS2*, которые выявляются у пациентов с синдромом Линча. Однако впервые семью, которая включала 146 случаев рака толстой кишки, желудка или эндометрия описал не Lynch H.T., а другой американский исследователь – Warthin A.S., и произошло это событие в 1913 году. Поскольку представители данной семьи прибыли в Америку из Германии, доктор Warthin A.S. дал ей обозначение «семья G» [31]. Однако после его смерти в 1931 году отслеживание данной семьи прекратилось на долгие годы. И уже повторное «открытие» этого синдрома принадлежит также американскому ученому Lynch H.T., который в 1965 году описал «семью N» (по месту проживания – штат Небраска), у представителей которой также встретились случаи неполипозного колоректального рака. В дальнейшем, именно Lynch H.T. вел поиск и исследование таких семей, что позволило дать этому синдрому его имя [1,17].

Примерно 3% всех случаев колоректального рака обусловлены синдромом Линча. При этом первая опухоль у европейцев и североамериканцев развивается, преимущественно, (60-80% случаев) в правых отделах толстой кишки [10]. Частота встречаемости синдрома Линча у европейцев составляет, примерно, 1:1000. Таким образом, до 1 000 000 человек в Европе имеют патогенную мутацию в одном из генов репарации ДНК, что с вероятностью в 70-75% может привести к развитию у них рака толстой кишки [10,22]. Кроме того, у таких пациентов могут возникать опухоли эндометрия, органов мочевыделительной системы, молочной железы, тонкой кишки, желудка и т. д. Целесообразность генетической диагностики синдрома Линча продиктована необходимостью индивидуального клинического мониторинга пациента, выполнения у него расширенного объема оперативного вмешательства в случае развития рака толстой кишки, а также возможностью эффективного применения таргетного препарата Pembrolizumab [10,15].

Клинический мониторинг пациентов с синдромом Линча должен включать проведение колоноскопии с возраста 20-25 лет ежегодно, а также эзофагогастродуоденоскопию, выполнение УЗИ брюшной полости, анализ мочи и гинекологические обследования у женщин с возраста 30-35 лет также ежегодно [10].

В случае развития опухоли толстой кишки пациенту показано выполнение колэктомии с формированием илеоректального анастомоза из-за высокого риска развития метакронной опухоли в оставшихся отделах толстой кишки в случае выполнения стандартного объема оперативного вмешательства. Однако при возникновении первого эпизода колоректального рака у пациента в возрасте

старше 60 лет возможно выполнение стандартной резекции. В любом случае, объем планируемой операции необходимо обсудить с больным, так как именно за ним остается принятие окончательного решения [10].

Наиболее перспективным представляется применение у пациентов с синдромом Линча нового препарата Pembrolizumab, эффективность которого доказана высокими показателями как безрецидивной, так и общей выживаемости у такого рода больных [15].

Описанный алгоритм клинического мониторинга и лечения пациентов с синдромом Линча однозначно указывает на необходимость отбора пациентов с наследственными мутациями в генах системы репарации ДНК. Однако невозможность проведения генетического исследования у всех больных колоректальным раком диктует необходимость разработки рациональных критериев, позволяющих целенаправленно проводить поиск мутаций.

Впервые такие критерии были предложены в Амстердаме Vasen H.F. и соавт. в 1991 году. Они указывали на высокую вероятность синдрома Линча у пациентов с неполипозным колоректальным раком в возрасте до 50 лет, имеющих еще как минимум 2 родственников из разных поколений, пораженных раком толстой кишки [28]. В 1999 году эти рекомендации расширили дополнительным пунктом о случаях рака другой локализации [30]. В настоящее время наиболее часто применяются именно вторые Амстердамские критерии, разработанные в 1999 году. При этом в 1996 году американскими исследователями были предложены оригинальные, а в 2004 – пересмотренные рекомендации Бетезда [27]. Эти рекомендации в большинстве пунктов повторяли Амстердамские критерии, но также имели указание на целесообразность изучения МСН в образце опухоли больного.

В 1997 году, после выхода оригинальных рекомендаций Бетезда, была предложена первая панель для исследования МСН в опухолях толстой кишки. Данная панель включала 2 мононуклеотидных маркера, таких как BAT25 и BAT26, а также 3 динуклеотидных маркера: D5S346, D2S123 и D17S250. Результаты исследования трактовались следующим образом: опухоль микросателлитно-стабильна (microsatellite stable [MSS]), когда все маркеры не изменены; опухоль с низким уровнем МСН, когда изменен 1 маркер (low level of microsatellite instability [MSI-L]); опухоль с высоким уровнем МСН, если изменено более 1 маркера (high level of microsatellite instability [MSI-H]) [7]. В 2002 году выходит вторая панель для определения МСН в колоректальных опухолях, которая включает все 5 мононуклеотидных маркеров: BAT25,

BAT26, NR21, NR22 и NR24 [24]. В настоящее время для генетической диагностики МСН, в основном, применяются именно эти 2 панели. Определять МСН возможно с помощью методов электрофореза и фрагментного анализа [3,5].

Крайне важно отметить, что исследование МСН в образце опухоли пациента позволяет проводить дифференциальный диагноз больных с синдромом Линча и семейным колоректальным раком X типа, для которого характерны случаи неполипозного колоректального рака у нескольких кровных родственников в возрасте, как правило, старше 50 лет. При этом мутации в генах системы репарации ДНК у этих больных не встречаются и, соответственно, в их опухолевой ткани не определяется МСН [21].

В 2014 году в ФГБУ «ГНЦ Колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России были предложены собственные критерии поиска российских пациентов с синдромом Линча [3]. Они также указывали на целесообразность исследования МСН в опухолевой ткани толстой кишки у пациентов в возрасте моложе 45 лет или у больных, страдающих колоректальным раком, в семье которых отмечено наличие 2 и более случаев Линч-ассоциированных опухолей у кровных родственников. Эффективность использования предложенных критериев у российских пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями, превысила показатели выявления синдрома Линча, как при использовании Амстердамских критериев, так и рекомендаций Бетезда [3].

Помимо генетических методов поиска МСН в колоректальных опухолях, возможно использование и иммуногистохимического (ИГХ) метода. С помощью метода ИГХ определяется экспрессия белков системы репарации ДНК. Отсутствие определенного белка предполагает наличие наследственной мутации в соответствующем гене [9].

Для сравнения генетических и ИГХ методов определения МСН рассчитывались показатели их чувствительности и специфичности. Так, показатель чувствительности генетических методов у пациентов с мутациями в генах *MLH1* и *MSH2* составляет от 80 до 91%, а при мутациях в генах *MSH6* и *PMS2* – от 55% до 77%. Показатель специфичности генетических тестов составляет 90%. Чувствительность метода ИГХ – 83%, а специфичность – 89% [6]. Однако эти показатели могут варьировать в зависимости от используемых в различных лабораториях методик и панелей определения МСН. Так, наиболее интересными, ввиду размера анализируемой выборки, представляются результаты немецких исследователей. У 230 пациентов с подтвержденным диагнозом синдром Линча, генетически МСН была определена во всех 230 образцах опухо-

ли, т. е. чувствительность метода составила 100%. Однако при использовании метода ИГХ МСН была выявлена только в 216 образцах, таким образом, чувствительность метода была 94% [8]. При этом стоит отметить, что в данном случае методом ИГХ исследовались только белки *MLH1* и *MSH2*, а при изучении всех 4 белков показатель чувствительности мог быть выше [29].

Как указывалось ранее, МСН может выявляться не только при синдроме Линча, но и в 12% sporadических опухолей [33]. В данном случае она обусловлена биаллельным гиперметилированием промоторного участка гена *MLH1* [26]. Интересным является тот факт, что МСН встречается у 20-22% пациентов со 2 стадией заболевания, у 12% больных с 3 стадией и только у 2-4% пациентов с 4 стадией заболевания [2,23]. Стоит также отметить, что почти у половины больных старше 90 лет в опухоли выявляется МСН [13]. Исследовать МСН у sporadических пациентов целесообразно при 2 стадии заболевания для решения вопроса о необходимости проведения адъювантной химиотерапии [14]. Важно подчеркнуть, что наличие МСН в опухолевой ткани пациента является положительным фактором прогноза [4,14]. Вместе с тем, в 40-50% sporadических опухолей с МСН встречаются соматические мутации в гене *BRAF*, что само по себе является фактором крайне неблагоприятного прогноза [32]. Рассмотрим более подробно ситуации, при которых целесообразно проводить исследование МСН при sporadических опухолях толстой кишки.

Исследование РЕТАСС-3, проведенное у 1254 больных колоректальным раком, выявило, что показатели как общей, так и безрецидивной выживаемости пациентов как со 2, так и с 3 стадией заболевания зависят от наличия или отсутствия в опухоли МСН. У пациентов, у которых определялась МСН в опухолевой ткани, показатели выживаемости были существенно выше [14]. Назначение адъювантной химиотерапии (5 – ФУ) не оказывало какого-либо существенного влияния на показатели как безрецидивной, так и общей выживаемости пациентов со 2 стадией колоректального рака, у которых имелась МСН в опухолевой ткани [14].

Как указывалось выше, у части пациентов с МСН в опухоли встречаются соматические мутации в гене *BRAF*. При этом, по разным данным, мутации в гене *BRAF* встречаются у 8-15% пациентов с колоректальным раком. Мутации в гене *BRAF*, как правило, обнаруживаются у больных после 70-75 лет, и являются факторами плохого прогноза. Наиболее часто в гене *BRAF* встречается мутация p.V600E, которая индуцирует миграцию и инвазивные свойства клеток аденокарциномы [18,32].

С целью выяснения прогноза у пациентов, в чьих опухолях одновременно встречались МСН и мутация в гене *BRAF*, проводилось несколько исследований. Наиболее крупной является работа американских авторов, проанализировавших данные 1253 больных с колоректальным раком [16]. Мутация в гене *BRAF* была обнаружена у 182 (14,5%) пациентов, а МСН – у 193 (15,4%) больных. Из 193 пациентов с МСН у 101 (52%) имелась и соматическая мутация в гене *BRAF*. Показатели безрецидивной и общей выживаемости пациентов с МСН-опухолями были выше у больных без мутации в гене *BRAF*, в сравнении с теми, у кого она встретилась. При этом показатели общей выживаемости пациентов в группе с МСН были выше, вне зависимости от мутации в гене *BRAF*, по сравнению с пациентами с микросателлитно-стабильными опухолями (МСС) [16].

Еще более интересные данные были получены исследователями из Японии, которые проанализировали 472 образца колоректального рака [19]. Микросателлитная нестабильность была выявлена в 44 (9,3%) образцах опухоли. Из них в 18 (40,9%) случаях имелась мутация в гене *BRAF*. Из 428 пациентов с МСС-опухолями мутация в гене *BRAF* обнаружилась у 23 (5,4%) человек. При этом выявлено статистически значимое отрицательное влияние мутации гена *BRAF* на показатели общей 5-летней выживаемости у пациентов с МСС-опухолями ($p=0,0004$; $HR=2,621$). Однако не выявлено статистически значимой разницы в показателях 5-летней общей выживаемости больных с МСН-опухолями в зависимости от наличия или отсутствия мутации в гене *BRAF* ($p=0,4655$; $HR=0,6443$). Нельзя не упомянуть про еще одно мультицентровое исследование о влиянии мутации в гене *BRAF* и МСН на прогноз заболевания, проведенное у европейских пациентов с метастатическим колоректальным раком [31]. Было изучено 3063 образца колоректального рака. Микросателлитная нестабильность выявлена в 153 (5,0%) случаях, а мутация в гене *BRAF* – в 250 (8,2%). При этом мутация в гене *BRAF* встретилась у 53 (34,6%) пациентов с МСН-опухолями и у 197 больных с МСС-опухолями ($p<0,001$). Показатели как безрецидивной, так и общей выживаемости были хуже как у больных с МСН-опухолями (по сравнению с пациентами с МСС-опухолями) (HR 1.33, 95% ДИ [1.12-1.57] и HR 1.35, 95% ДИ [1.13-1.61], соответственно), так и у пациентов с мутацией в гене *BRAF* по сравнению с пациентами без данной мутации (HR 1.34, 95% ДИ [1.17-1.54] и HR 1.91, 95% ДИ [1.66-2.19], соответственно). В результате, авторы указывают, что наличие МСН и мутация в гене *BRAF* являются факторами плохого прогноза у пациентов с метастатическим колоректальным раком,

однако, предполагают, что плохой прогноз у пациентов с МСН-опухолями может быть обусловлен в большей степени наличием у них мутации в гене *BRAF*.

Таким образом, определение МСН при колоректальном раке крайне важно у пациентов до 45 лет или у больных с отягощенным семейным анамнезом для дальнейшей генетической диагностики синдрома Линча, так как данный синдром устанавливается только на основании наличия наследственной мутации в одном из генов системы репарации ДНК. Кроме того, определение статуса МСН показано пациентам со 2 стадией колоректального рака для решения вопроса о назначении адъювантной химиотерапии, а также тем больным, у которых была выявлена соматическая мутация в гене *BRAF* с целью уточнения прогноза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семенов Д.А., Ачкасов С.И., Цуканов А.С. и соавт. Синдром Линча. От «семьи G» до ДНК-диагностики. Колопроктология. – 2014. – №3. – с. 57-61.
2. Федянин М.Ю., Трякин А.А., Тюляндин С.А. Роль микросателлитной нестабильности при раке толстой кишки. Онкологическая колопроктология. – 2012. – №3. – с. 19-25.
3. Цуканов А.С., Поспехова Н.И., Шубин В.П. и соавт. Дифференциальный диагноз синдрома Линча от других форм неполипозного колоректального рака среди российских пациентов. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – т. 24. – №2. – с. 78-84.
4. Чернышов С.В. Скрининг колоректального рака. Обзор литературы. Колопроктология. – 2009. – № 2. – с. 55-59.
5. Янус Г.А., Корнилов А.В., Суспицын Е.Н. и соавт. Молекулярно-генетическая диагностика наследственного неполипозного рака толстой кишки. Сибирский онкологический журнал. – 2012. – № 2. – с. 29-38.
6. Berg A., Armstrong K., Botkin J. et al. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet. Med. – 2009 Jan; 11 (1): 35-41.
7. Dietmaier W., Wallinger S., Bocker T. et al. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. Cancer. Res. – 1997 Nov; 57 (21): 4749-56.
8. Engel C., Forberg C., Holinski-Feder E. et al. Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite

analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int. J. Cancer.* – 2006 Jan 1; 118 (1): 115-22.

9. Evans D.G., Walsh S., Hill J. et al. Strategies for identifying hereditary nonpolyposis colon cancer. *Semin. Oncol.* – 2007 Oct; 34 (5): 411-7.

10. Giardiello F., Allen J., Axilbund J. et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Dis. Colon. Rectum.* – 2014 Aug; 57 (8): 1025-48.

11. Gruber S. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology.* – 2006 Feb; 130 (2): 577-87.

12. Ionov Y., Peinado M., Malkhosyan S. et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colorectal carcinogenesis. *Nature.* – 1993 Jun 10; 363 (6429): 558-61.

13. Kakar S., Burgart L.J., Thibodeau S.N. et al. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer.* – 2003 Mar 15; 97 (6): 1421-7.

14. Klingbiel D., Saridaki Z., Roth A. et al. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Ann. Oncol.* – 2015 Jan; 26 (1): 126-32.

15. Le D., Uram J., Wang H. et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* – 2015 Jun 25; 372 (26): 2509-20.

16. Lochhead P., Kuchiba A., Imamura Y. et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J. Natl. Cancer Inst.* – 2013 Aug 7; 105 (15): 1151-6.

17. Lynch H.T., Shaw M.W., Magnuson C.W. et al. Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* – 1966 Feb; 117 (2): 206-12.

18. Makrodouli E., Oikonomou E., Koc M. et al. BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol. Cancer.* – 2011 Sep 23; 10: 118.

19. Nakaji Y., Oki E., Nakanishi R. et al. Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* – 2016 Sep 26. [Epub ahead of print].

20. Peltomaki P., Aaltonen L.A., Sistonen P. et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science.* – 1993 May 7; 260 (5109): 810-2.

21. Potter J., Lindor N. Genetics of colorectal cancer. *Springer.* – 2008. – p. 185.

22. Rahner N., Steinke V., Schlegelberger B. et al. Clinical utility gene card for: Lynch syndrome (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). *Eur. J. Hum. Genet.* – 2010 Sep; 18 (9).

23. Roth A.D., Tejpar S., Delorenzi M. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J. Clin. Oncol.* – 2010 Jan 20; 28 (3): 466-74.

24. Suraweera N., Duval A., Reperant M. et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology.* – 2002 Dec; 123 (6): 1804-11.

25. Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D.J. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* – 1993 May 7; 260 (5109): 816-9.

26. Thibodeau S., French A., Cunningham J. et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer. Res.* – 1998 Apr 15; 58 (8): 1713-8.

27. Umar A., Boland C., Terdiman J. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* – 2004 Feb 18; 96 (4): 261-8.

28. Vasen H.F., Mecklin J.P., Khan P.M. et al. International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum.* – 1991 May; 34 (5): 424-5.

29. Vasen H., Moslein G., Alonso A. et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J. Med. Genet.* – 2007 Jun; 44 (6): 353-62.

30. Vasen H.F., Watsan P., Mecklin J.P. et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* – 1999 Jun; 116 (6): 1453-6.

31. Venderbosch S., Nagtegaal I., Maughan T. et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin. Cancer Res.* – 2014. – 15; 20 (20): 5322-30.

32. Warthin A.S. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the Pathological Laboratory of the University of Michigan, 1895-1912. *Arch. Int. Med.* – 1913; 12: 546-55.

33. Wellbrock C., Karasarides M., Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2004 Nov; 5 (11): 875-85.

34. Yuan L., Chi Y., Chen W. et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int. J. Clin. Exp. – Med.* 2015 Nov 15; 8 (11): 20988-1000.