

## МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ

М. Ю. Мещерякова , Е. Н. Колесников, В. С. Трифанов, Н. Н. Тимошкина, А. В. Снежко, Д. Ю. Гвалдин

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, Ростов-на-Дону, Россия

С нарушением работы системы репарации неспаренных оснований ДНК связано понятие о микросателлитной нестабильности (MSI), характеризующей особый молекулярно-биологический подтип злокачественных опухолей. Достоверные данные о частоте встречаемости MSI в нейроэндокринных новообразованиях толстой кишки отсутствуют, что связано с относительно небольшим числом пациентов. Сведения о прогностической значимости MSI также противоречивы. Целью исследования было изучение частоты встречаемости MSI в нейроэндокринных новообразованиях (НЭН) толстой кишки в зависимости от локализации, степени дифференцировки опухоли и стадии заболевания. Включенные в исследование 29 пациентов были прооперированы в период с 2015 по 2018 г. по поводу нейроэндокринных новообразований толстой кишки (мужчины — 15 человек, женщины — 14 человек, средний возраст постановки диагноза — 62,5 лет). Средний срок наблюдения составил 3,8 лет. НЭН толстой кишки были распределены по локализациям, а также по стадиям заболевания. У большинства пациентов, включенных в исследование, была диагностирована III стадия заболевания (52%). Статус микросателлитной стабильности (MSS) был подтвержден у 24 пациентов (83%), тогда как MSI-статус — у пяти (17%) соответственно. Все случаи MSI-положительных новообразований соответствовали высокодифференцированным G1 и G2 нейроэндокринным опухолям прямой кишки на I стадии заболевания. Общая выживаемость пациентов с MSS-положительными НЭН толстой кишки составила на II стадии — 50%, на III — 33%, на IV стадии — 0%. Общая выживаемость пациентов с MSI-положительными НЭН прямой кишки на I стадии составила 100%. Таким образом, была определена частота встречаемости MSI-положительных НЭН толстой кишки.

**Ключевые слова:** нейроэндокринные новообразования толстой кишки, микросателлитная нестабильность, общая выживаемость, прогноз

**Вклад авторов:** Е. Н. Колесников — получение, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи; В. С. Трифанов — дизайн исследования, редактирование статьи; Н. Н. Тимошкина — анализ и интерпретация полученных данных, написание текста статьи; А. В. Снежко — получение данных для анализа; Д. Ю. Гвалдин — анализ и интерпретация полученных данных; М. Ю. Мещерякова — обзор публикаций, написание текста статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ онкологии (протокол № 3 от 09 февраля 2021 г.); все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Милана Юрьевна Мещерякова  
ул.14-линия, д. 63, г. Ростов-на-Дону; mesheryakovamilana@mail.ru

**Статья получена:** 12.01.2022 **Статья принята к печати:** 27.01.2022 **Опубликована онлайн:** 14.02.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.004

## MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL NEUROENDOCRINE NEOPLASMS

Meshcheryakova MYu , Kolesnikov EN, Trifanov VS, Timoshkina NN, Snezhko AV, Gvaldin DYu

National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Microsatellite instability (MSI) characterizes a special molecular genetic subtype of malignancies and is associated with the deficiency of mismatched DNA repair. There are no reliable data on the frequency of MSI in colorectal neuroendocrine neoplasms due to the relative rarity of this cancer type. The prognostic significance of MSI is debatable. The aim of this study was to investigate the frequency of the MSI phenotype among colorectal neuroendocrine neoplasms (NENs) with different primary location, grade and stage. Twenty-nine patients (15 men and 14 women, mean age: 62.5 years) included in the study underwent surgery for colorectal neuroendocrine tumors between 2015 and 2018. The mean follow-up period was 3.8 years. Colorectal NENs were grouped by primary location and stage. The majority of the patients (52%) had stage III cancer at diagnosis. The microsatellite stability (MSS) phenotype was confirmed in 24 patients (83%), whereas the MSI phenotype was observed in 5 patients (17%). All MSI-positive tumors were stage I well-differentiated grade G1 or G2 neuroendocrine tumors (NETs) of the rectum. Overall survival was 50% for patients with stage II MSS-positive NENs of the colon and rectum, 33% for stage III and 0% for stage IV. For patients with stage I MSI-positive NENs of the rectum, overall survival was 100%. Thus, the frequency of MSI-positive colorectal NENs was estimated.

**Keywords:** colorectal neuroendocrine neoplasms, microsatellite instability, overall survival, prognosis

**Author contributions:** Kolesnikov EN — data collection, analysis and interpretation; manuscript editing; Trifanov VS — study design; data collection, manuscript editing; Timoshkina NN — data analysis and interpretation; manuscript preparation; Snezhko AV — data acquisition; Gvaldin DYu — data analysis and interpretation; Meshcheryakova MYu — literature analysis; manuscript preparation.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Centre for Oncology (Protocol № 3 dated February 9, 2021); informed consent was obtained from all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Milana Yu. Mesheryakova  
14 liniya, 63, Rostov-on-Don; mesheryakovamilana@mail.ru

**Received:** 12.01.2022 **Accepted:** 27.01.2022 **Published online:** 14.02.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.004

Система репарации неспаренных оснований — уникальный биологический механизм восстановления повреждений ДНК, возникающих в процессе клеточного деления [1]. Работу данной системы обеспечивают белковые продукты шести ключевых генов (*MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH3*, *MSH6* и *MLH3*). Наследственная или спорадическая

генетическая мутация или иное эпигенетическое событие (например, гиперметилирование промотора *MLH1*) способно инактивировать любой из генов и нарушить функционирование всего механизма [2]. Непосредственный результат данных изменений — накопление большого количества неисправленных мутаций в геноме, а

также изменение длины микросателлитов (коротких последовательностей, состоящих из 2–9 пар нуклеотидов и располагающихся в эухроматиновой части генома) [3]. Следствием этого может быть сдвиг рамки считывания в кодирующей последовательности (если микросателлит располагается в интроне) с последующей инактивацией различных генов. Таким образом, нарушение работы системы репарации неспаренных оснований ДНК ведет к появлению такого фенотипического состояния генома, как микросателлитная нестабильность (MSI) [1].

Менее агрессивную природу MSI-положительных опухолей связывают с высокой скоростью мутирования, что приводит к большому уровню антигенной нагрузки, стимулирующей противоопухолевый иммунный ответ. В итоге опухоли с MSI должны лучше реагировать на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек (ИКТ), что и было подтверждено в отношении меланомы, рака желудка и колоректального рака (КРР). Однако прогностическое значение MSI на поздних стадиях КРР (IV) остается противоречивым [4].

Таким образом, на сегодняшний день MSI является ценным предиктором ответа опухоли на иммунотерапию независимо от локализации первичной опухоли [1].

Универсальность данного маркера способствует тому, что наряду с расширением показаний для применения ИКТ, определение статуса MSI становится необходимой диагностической опцией, единогласно одобренной крупнейшими мировыми онкологическими сообществами, такими как ASCO, ESMO, NCCN, RUSSCO [2]. Так, статус MSI имеет немаловажное значение при выборе тактики ведения пациентов с КРР на ранних стадиях, что отражено в ныне действующих клинических рекомендациях по лечению данной патологии [5].

В отношении нейроэндокринных новообразований (НЭН) толстой кишки не было проведено ни одного рандомизированного клинического исследования по изучению эффективности применения иммунотерапии в различных режимах. Кроме того, распространенность MSI среди НЭН толстой кишки, в частности, и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в целом, недостаточно изучена, так же, как и ее влияние на прогноз.

Мы предполагаем, что НЭН толстой кишки с MSI-положительным статусом представляют собой обособленную категорию опухолей с иным клиническим течением и прогнозом. Ввиду относительной редкости НЭН толстой кишки существуют некоторые трудности с набором большой выборки пациентов. В наиболее

масштабных молекулярно-генетических исследованиях НЭН толстой кишки число включенных пациентов не превышало в среднем 100 человек. Так, в одной из более ранних работ при изучении распространенности MSI в нейроэндокринных карциномах (НЭК) ( $n = 53$ ) и смешанных нейроэндокринных карциномах ЖКТ ( $n = 36$ ) MSI-статус был подтвержден в 12,4% случаев (11/89), в том числе в НЭК толстой кишки, желудка, двенадцатиперстной кишки [6]. Авторы выделили некоторые клинико-патологические и молекулярно-генетические особенности MSI-положительных опухолей: MSI-положительные карциномы демонстрировали выраженный паттерн метилирования генов (40,6% против 20,2% метилированных генов соответственно), из которых преимущественно эпигенетическим изменениям подвергались гены *MLH1*, *p16*, *PAX6*, *PAX5*, *THBS1*, *TP73*, *DAPK1*, *MGMT*, *PCYCARD*, *CDH13*, *HIC1* и *TIMP3*. При этом MSI коррелировала с наличием мутации гена *BRAF* [6]. Представленные результаты наглядно демонстрируют то, что MSI-статус сочетается с определенным набором молекулярных характеристик опухоли. В их изучении мы видим перспективу для дальнейшей исследовательской деятельности. Целью нашего исследования было изучить статус MSI в НЭН толстой кишки в зависимости от локализации первичной опухоли, степени дифференцировки, а также стадии заболевания.

#### ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 29 пациентов, которые были прооперированы в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (г. Ростов-на-Дону) в период с 2015 по 2018 г. по поводу НЭН толстой кишки. Из них мужчины — 15 человек, женщины — 14 человек, средний возраст постановки диагноза — 62,5 лет. Средний период наблюдения за пациентами составил 3,8 лет. Критерии включения в исследование: подтвержденный иммуногистохимическим методом профиль экспрессии маркеров нейроэндокринной дифференцировки (хромогранин А, синаптофизин); подписанное пациентами информированное согласие на участие в научном исследовании. Все гистологические препараты были пересмотрены согласно критериям классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2019 г.

Для работы использовали парафиновые блоки операционного материала, из которых осуществляли экстракцию ДНК. Основные этапы экстракции ДНК включали отделение 10 слайсов от массива парафинового

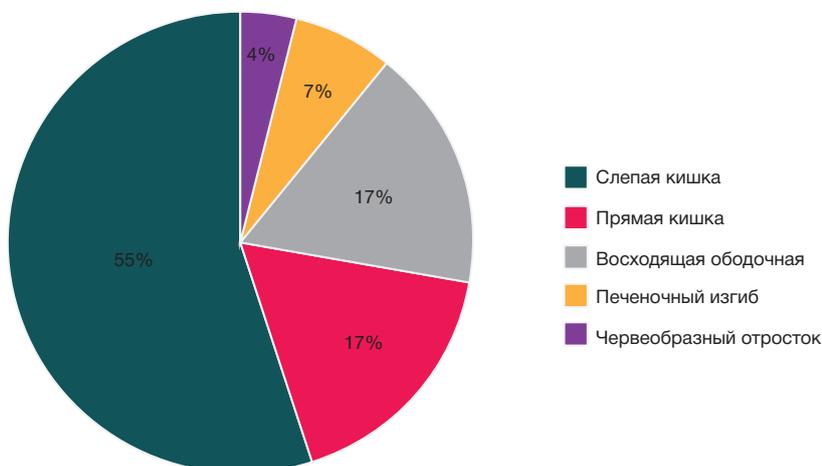


Рис. 1. Распределение НЭН толстой кишки по локализациям

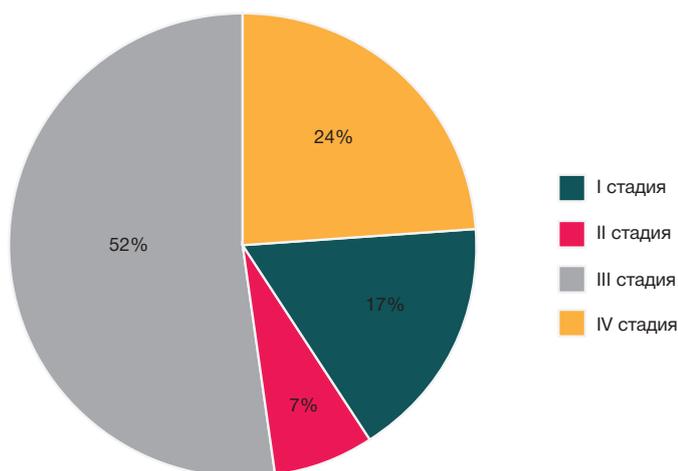


Рис. 2. Распределение НЭН толстой кишки по стадиям

блока, содержащего операционный биоптат опухолевой или условно нормальной ткани, с помощью микротомы; депарафинизацию в ксилоле, инкубацию в лизирующем буфере в присутствии фермента протеиназы К до полного лизиса ткани (экспозиция при 58 °С в течение 6–12 ч), выделение и доочистку препарата тотальной ДНК с использованием реактива набора «ДНК-сорб В» («Амплиценс»; Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически на Qubit 2.0 (LifeTechnologies; США).

MSI определяли методом фрагментного анализа выделенной ДНК с использованием пяти мономорфных микросателлитных локусов (NR21, NR24, NR27, BAT25 и BAT26). На матрице каждой выделенной тотальной ДНК проводили пять реакций амплификации. В состав ПЦР-смеси входило: 20 мкл с 10–20 нг ДНК, 0,175 мкМ каждого праймера, 2 мМ dNTP, 15 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,5 ед. Таq-полимеразы. Амплификацию проводили с соблюдением следующих условий: начальная денатурация 5 мин при 94 °С, затем денатурация 40 циклов по 30 с при 94 °С, отжиг при 59 °С, элонгация при 72 °С и заключительная элонгация 45 с при 72 °С. Диапазон размеров ПЦР-продукта составил от 50 до 350 пн.

Флуоресцентно меченный ПЦР-продукт детектировали посредством фрагментного анализа. Для этого смешивали 1 мкл ПЦР-продуктов с 19 мкл Hi-Di формамида и 0,5 мкл GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard (Thermo Fisher; США).

Пробы инкубировали в твердотельном термостате CH-100 (Biosan; США) в течение 5 мин при 95 °С, затем загружали в генетический анализатор ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems; США). Запуск осуществляли по протоколу, рекомендованному производителем. Полученные данные анализировали в GeneMapper Software (Thermo Fisher; США). Минимальный предел обнаружения пика составлял 50 относительных флуоресцентных единиц (RFU). При условии полиморфности двух и более локусов регистрировали MSI. Метилирование гена *MLH1* определяли методом пиросеквенирования бисульфит-конвертированной ДНК с помощью набора PyroMark Q24 CpG *MLH1* согласно инструкции производителя (Qiagen; Германия).

С помощью программного обеспечения Statsoft Statistica 10,0 (StatSoft; США) в среде операционной системы Windows 10 проводили статистическую обработку данных. Для первичной математической обработки полученных данных использовали методы описательной статистики (расчет мер центральной тенденции и мер изменчивости).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

НЭН толстой кишки были разделены по локализациям. Из них НЭН слепой кишки составили 55% ( $n = 16$ ), прямой кишки — 17% ( $n = 5$ ), восходящей ободочной кишки —

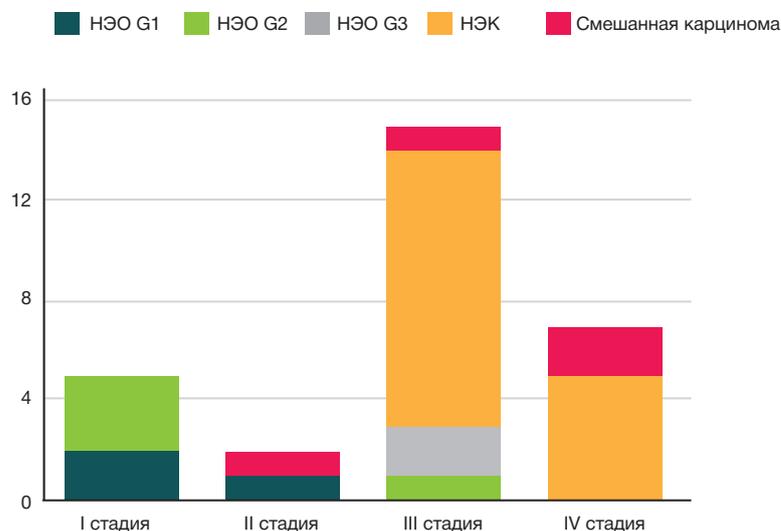


Рис. 3. Распределение пациентов в соответствии с гистологическим подтипом НЭН и стадиями заболевания

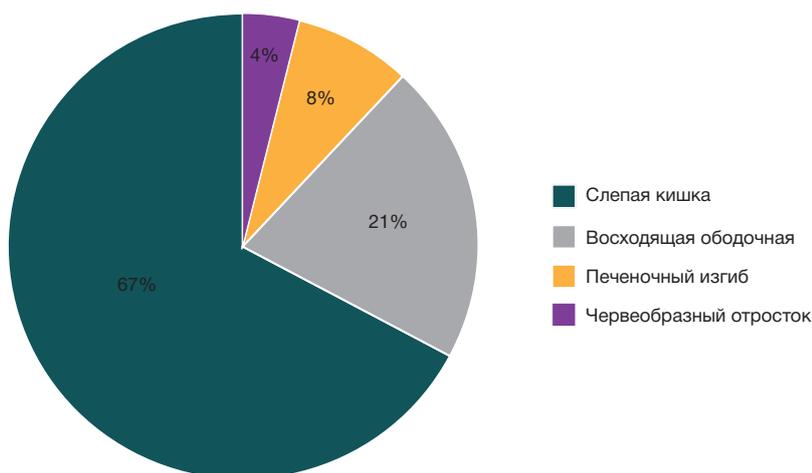


Рис. 4. Распределение НЭН толстой кишки с подтвержденным статусом MSS в соответствии с локализацией и стадией заболевания

17% ( $n = 5$ ), печеночного изгиба оболочной кишки — 7% ( $n = 2$ ), аппендикса — 4% ( $n = 1$ ) (рис. 1).

У большинства пациентов, включенных в исследование, была установлена III стадия заболевания (52%,  $n = 15$ ) (рис. 2).

НЭК толстой кишки были диагностированы чаще других гистологических подтипов (55%,  $n = 16$ ), частота их выявления была прямо пропорциональна повышению стадии заболевания. Распределение пациентов в соответствии с гистологическим подтипом НЭН и стадиями заболевания продемонстрировано ниже (рис. 3).

Микросателлитная стабильность (MSS) была подтверждена в 83% случаях ( $n = 24$ ), тогда как MSI-позитивный статус — в 17% ( $n = 5$ ). Все MSI-позитивные опухоли соответствовали высокодифференцированным G1 ( $n = 2$ ) и G2 ( $n = 3$ ) нейроэндокринным опухолям прямой кишки на I стадии. Отметим, что микросателлитная нестабильность была определена по всем пяти тестируемым STR-локусам во всех случаях.

Уровень метилирования гена *MLH1* характеризовался гиперметилированием всех образцов с MSI (Me = 20%, диапазон 14–42%) и гипометилированием образцов с MSS-статусом (Me = 4%, диапазон 4–14%). На основании полученных данных можно заключить, что ведущей причиной MSI-статуса в НЭН толстой кишки стало ингибирование транскрипции ключевого гена системы репарации неспаренных оснований ДНК посредством гиперметилирования его промотора. Данный механизм описан для спорадических колоректальных аденокарцином.

Распределение НЭН толстой кишки с подтвержденным статусом MSS в соответствии с локализацией и стадией заболевания продемонстрировано на рис. 4 и 5.

Трехлетняя выживаемость пациентов с MSS-позитивными НЭН толстой кишки составила на II стадии 50%, на III стадии — 33%, на IV стадии — 0%. Трехлетняя выживаемость пациентов с MSI-H-позитивными НЭН прямой кишки на I стадии была равна 100%.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучая распространенность микросателлитной нестабильности среди НЭН толстой кишки, нельзя не сравнить полученные данные с теми, которые на сегодняшний день представлены для колоректального рака. В недавно проведенном исследовании отечественных авторов в российской когорте пациентов с КРП ( $n = 359$ ) MSI-статус был обнаружен в 6,4% случаев (23/359), причем он коррелировал с более молодым возрастом пациентов ( $p = 0,023$ ), наличием первично-множественных опухолевых поражений ( $p = 0,0299$ ), наличием муцинозного компонента ( $p < 0,0001$ ), а также низкой степенью дифференцировки ( $p = 0,0025$ ) и с правосторонней локализацией опухоли в толстой кишке ( $p < 0,0001$ ) [7]. По нашим данным, все выявленные MSI-позитивные НЭН ( $n = 5$ ) локализовались в прямой кишке и имели высокую степень дифференцировки.

В настоящее время для КРП четко установлена тенденция снижения частоты выявления MSI с увеличением стадии

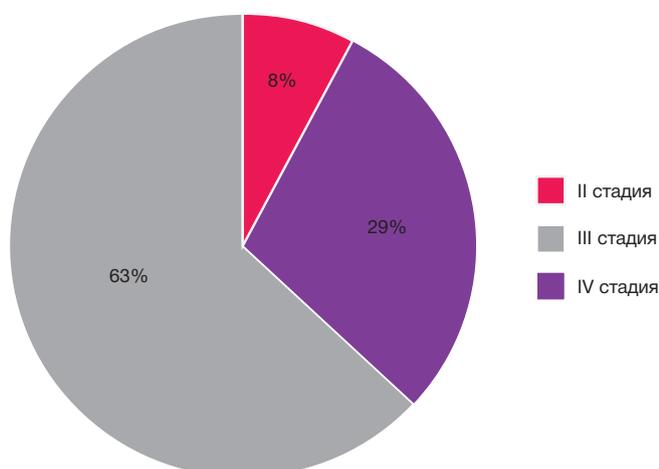


Рис. 5. Распределение НЭН толстой кишки с подтвержденным статусом MSS в соответствии со стадией заболевания

опухолевого процесса [1, 3–5]. В нашем исследовании все выявленные случаи MSI-положительных НЭН толстой кишки соответствовали I стадии заболевания. При расширении выборки с включением достаточного числа пациентов на каждой стадии заболевания будет возможным достоверно судить о проявлении данной тенденции в отношении НЭН толстой кишки.

Ранее нами была изучена микросателлитная нестабильность в высококодифференцированных (G1/G2) нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы. Сравнивая полученные результаты, можно утверждать, что характер MSI-статуса и частота его встречаемости среди НЭН поджелудочной железы и толстой кишки имеет некоторые различия. Так, MSI-статус был подтвержден в 14% случаев НЭН поджелудочной железы [8]. В настоящем исследовании мы получили 17% MSI-положительных НЭН толстой кишки. Кроме того, в случаях MSI-положительных нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы не было установлено ассоциации с метилированием промотора гена *MLH1*, напротив, для НЭН толстой кишки MSI-положительный статус был связан исключительно с гиперметилированием *MLH1*. Возможно, этот эпигенетический механизм, характерный как для аденокарцином, так и для НЭН толстой кишки, связан со специфичностью колоректального происхождения опухолей.

В контексте НЭН ЖКТ очень важен критерий дифференцировки, что нашло отражение в модернизированной классификационной системе, принятой ВОЗ в 2019 г. НЭН высокой и низкой степени дифференцировки представляют собой совершенно гетерогенные по своим генетическим характеристикам подгруппы. К тому же НЭН различного органного происхождения также различаются по набору основных молекулярных маркеров. В связи с этим остро стоит вопрос, есть ли связь между степенью дифференцировки НЭН (соответственно, НЭО и НЭК), локализацией первичной опухоли и распределением MSI. Существующие на сегодняшний день в литературе данные остаются довольно противоречивыми. Так, из 239 изученных НЭН желудочно-кишечного тракта и легких только четыре опухолевых образца (НЭО G3 поджелудочной железы ( $n = 1$ ) и НЭК толстой кишки ( $n = 3$ )) оказались MSI-положительными [9]. В другом исследовании, где преобладающими локализациями первичной НЭК были желудок ( $n = 21$ ) и поджелудочная железа ( $n = 6$ ), ни в одном случае ( $n = 33$ ) не выявлена MSI [10]. В то же время по данным метаанализа, включившего 33 ретроспективных исследования и восемь клинических сообщений, MSI в среднем встречалась в 10% НЭК желудка и толстой кишки

[11]. MSI-статус не был также подтвержден ни в одном случае высококодифференцированных НЭО прямой кишки ( $n = 56$ ), тонкой кишки ( $n = 14$ ), толстой кишки ( $n = 38$ ) и поджелудочной железы ( $n = 16$ ) [9, 12–15]. По сообщениям других авторов, MSI-статус в НЭО поджелудочной железы встречается в 10–33% случаев [9]. В нашем исследовании большинство образцов были представлены НЭК толстой кишки (55%,  $n = 16$ ), однако ни в одном из них не был зарегистрирован статус MSI. В то же время, согласно литературным данным, MSI-статус НЭК толстой кишки был подтвержден в 16, 7, 10 и 14% случаев соответственно [6, 9, 17–21]. Анализируя данные литературы, можно сделать вывод о том, что частота встречаемости MSI выше среди низко дифференцированных форм НЭН. Однако результаты нашего исследования с подтверждением MSI только в высококодифференцированных G1 и G2 НЭО прямой кишки свидетельствуют об обратном. И все-таки достоверно судить о характере распределения MSI в НЭН толстой кишки будет возможным только после расширения выборки пациентов.

## Выводы

Таким образом, при изучении частоты встречаемости микросателлитной нестабильности в НЭН толстой кишки в зависимости от степени дифференцировки опухолей, их первичной локализации и стадии заболевания было выявлено 17% MSI-положительных образцов, все из которых соответствовали высококодифференцированным G1 и G2 НЭО с локализацией в прямой кишке на I стадии заболевания. Результаты, полученные нами при расчете трехлетней выживаемости пациентов, свидетельствуют о снижении данного показателя прямо пропорционально стадии заболевания. В настоящее время принято считать, что распространенность MSI среди НЭН соответствует таковой для аденокарцином той же органной принадлежности. Сопоставляя полученные нами данные с частотой встречаемости MSI в КРР, можно сказать, что для НЭН толстой кишки, а именно для их высококодифференцированных форм, может быть характерен больший процент MSI-положительных случаев (17% против 10–15%). В связи с этим стоит заметить, что в отличие от КРР, тестирование на MSI-статус НЭН не входит в диагностический стандарт, закрепленный действующими клиническими рекомендациями, что, по нашему мнению, несправедливо. Полученные нами результаты позволяют с осторожным оптимизмом говорить о том, что в отношении данной категории опухолей применение новейших иммунотерапевтических препаратов могло бы быть эффективным.

## Литература

1. Ratovomanana T, Cohen R, Svrcek M, Renaud F, Cervera P, Siret A, 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.
2. Echle A, Grabsch HI, Quirke P, van den Brandt PA, West NP, Hutchins GGA, et al. Clinical-Grade Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Tumors by Deep Learning. *Gastroenterology*. 2020; 159 (4): 1406–16.
3. Andre T, Amonkar M, Norquist JM, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, et al. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021; 22 (5): 665–77.
4. Diao Z, Han Y, Chen Y, Zhang R, Li J. The clinical utility of microsatellite instability in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021; 157 (1): 103–71.
5. Трякин А. А., Федянин М. Ю., Цуканов А. С., Шельгин Ю. А., Покатаев И. А., Игнатова Е. О. и др. Микросателлитная нестабильность как уникальная характеристика опухолей и предиктор эффективности иммунотерапии. *Злокачественные опухоли*. 2019; 9 (4): 59–69.

6. Sahnane N, Furlan D, Monti M, Romualdi C, Vanoli A, Vicari E, et al. Microsatellite unstable gastrointestinal neuroendocrine carcinomas: a new clinicopathologic entity. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22 (1): 35–45.
7. Мусаеян А. А., Назаров В. Д., Будникова А. С., Лапин С. В., Воробьев С. Л., Эмануэль В. Л. и др. Клинико-морфологический портрет опухолей с микросателлитной нестабильностью. Успехи молекулярной онкологии. 2021; 8 (2): 52–59.
8. Trifanov VS, Timoshkina NN, Gvaldin DYU, Mesheryakova MYU, Kolesnikov EN, Gaziev UM, et al. Study of microsatellite instability in neuroendocrine tumors of pancreas and colon. *Journal of Clinical Oncology*. 2021; 39 (15): 16196.
9. Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, et al. Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas. *Endocr Pathol*. 2020; 31 (2): 182–9.
10. Xing J, Ying H, Li J, Gao Y, Sun Z, Li J, et al. Immune Checkpoint Markers in Neuroendocrine Carcinoma of the Digestive System. *Front Oncol*. 2020; 28 (10): 132.
11. Girardi DM, Silva ACB, Rêgo JFM, Coudry RA, Riechelmann RP. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017; 56 (1): 28–35.
12. Mitsushashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, et al. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. *Oncotarget*. 2015; 6 (26): 22114–25.
13. Kidd M, Eick G, Shapiro MD, Camp RL, Mane SM, Modlin IM. Microsatellite instability and gene mutations in transforming growth factor-beta type II receptor are absent in small bowel carcinoid tumors. *Cancer*. 2005; 103 (2): 229–36.
14. Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, Bevilacqua G, Caligo MA. Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int J Oncol*. 1999; 15 (2): 361–6.
15. Arnold CN, Nagasaka T, Goel A, Scharf I, Grabowski P, Sosnowski A, et al. Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors. *Int J Cancer*. 2008; 123 (7): 1556–64.
16. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*. 2016; 22 (4): 813–20.
17. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, Sun W, Bahary N, Kuan SF, et al. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Hum Pathol*. 2016; 49 (1): 124–34.
18. Furlan D, Sahnane N, Mazzoni M, Pastorino R, Carnevali I, Stefanoli M, et al. Diagnostic utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling of adenocarcinomas and neuroendocrine carcinomas of the colon-rectum. *Virchows Arch*. 2013; 462 (1): 47–56.
19. La Rosa S, Marando A, Furlan D, Sahnane N, Capella C. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas and mixed adenoneuroendocrine carcinomas: insights into the diagnostic immunophenotype, assessment of methylation profile, and search for prognostic markers. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36 (4): 601–11.
20. Kit OI, Trifanov VS, Petrusenko NA, Gvaldin DY, Kutilin DS, Timoshkina NN. Identification of new candidate genes and signalling pathways associated with the development of neuroendocrine pancreatic tumours based on next generation sequencing data. *Mol Biol Rep*. 2020; 47 (6): 4233–43.
21. Кит О. И., Водолажский Д. И. Молекулярная биология колоректального рака в клинической практике. Молекулярная биология. 2015; 49 (4): 531–54.

## References

1. Ratovomanana T, Cohen R, Svrcek M, Renaud F, Cervera P, Siret A, 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.
2. Echle A, Grabsch HI, Quirke P, van den Brandt PA, West NP, Hutchins GGA, et al. Clinical-Grade Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Tumors by Deep Learning. *Gastroenterology*. 2020; 159 (4): 1406–16.
3. Andre T, Amonkar M, Norquist JM, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, et al. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021; 22 (5): 665–77.
4. Diao Z, Han Y, Chen Y, Zhang R, Li J. The clinical utility of microsatellite instability in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021; 157 (1): 103–71.
5. Trjakin AA, Fedjanin MYU, Cukanov AS, Shelygin YU, Pokataev IA, Ignatova EO, i dr. Mikrosatellitnaja nestabil'nost' kak unikal'naja harakteristika opuholej i prediktor jeffektivnosti immunoterapii. *Zlokachestvennye opuholi*. 2019; 9 (4): 59–69. Russian.
6. Sahnane N, Furlan D, Monti M, Romualdi C, Vanoli A, Vicari E, et al. Microsatellite unstable gastrointestinal neuroendocrine carcinomas: a new clinicopathologic entity. *Endocr Relat Cancer*. 2015; 22 (1): 35–45.
7. Musaeljan AA, Nazarov VD, Budnikova AS, Lapin SV, Vorobev SL, Jemanujel VL, i dr. Kliniko-morfologicheskij portret opuholej s mikrosatellitnoj nestabil'nost'ju. *Uspehi molekularnoj onkologii*. 2021; 8 (2): 52–59. Russian.
8. Trifanov VS, Timoshkina NN, Gvaldin DYU, Mesheryakova MYU, Kolesnikov EN, Gaziev UM, et al. Study of microsatellite instability in neuroendocrine tumors of pancreas and colon. *Journal of Clinical Oncology*. 2021; 39 (15): 16196.
9. Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, et al. Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas. *Endocr Pathol*. 2020; 31 (2): 182–9.
10. Xing J, Ying H, Li J, Gao Y, Sun Z, Li J, et al. Immune Checkpoint Markers in Neuroendocrine Carcinoma of the Digestive System. *Front Oncol*. 2020; 28 (10): 132.
11. Girardi DM, Silva ACB, Rêgo JFM, Coudry RA, Riechelmann RP. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017; 56 (1): 28–35.
12. Mitsushashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, et al. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. *Oncotarget*. 2015; 6 (26): 22114–25.
13. Kidd M, Eick G, Shapiro MD, Camp RL, Mane SM, Modlin IM. Microsatellite instability and gene mutations in transforming growth factor-beta type II receptor are absent in small bowel carcinoid tumors. *Cancer*. 2005; 103 (2): 229–36.
14. Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, Bevilacqua G, Caligo MA. Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int J Oncol*. 1999; 15 (2): 361–6.
15. Arnold CN, Nagasaka T, Goel A, Scharf I, Grabowski P, Sosnowski A, et al. Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors. *Int J Cancer*. 2008; 123 (7): 1556–64.
16. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res*. 2016; 22 (4): 813–20.
17. Olevian DC, Nikiforova MN, Chiosea S, Sun W, Bahary N, Kuan SF, et al. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. *Hum Pathol*. 2016; 49 (1): 124–34.
18. Furlan D, Sahnane N, Mazzoni M, Pastorino R, Carnevali I, Stefanoli M, et al. Diagnostic utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling of

- adenocarcinomas and neuroendocrine carcinomas of the colon-rectum. *Virchows Arch.* 2013; 462 (1): 47–56.
19. La Rosa S, Marando A, Furlan D, Sahnane N, Capella C. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas and mixed adenoneuroendocrine carcinomas: insights into the diagnostic immunophenotype, assessment of methylation profile, and search for prognostic markers. *Am J Surg Pathol.* 2012; 36 (4): 601–11.
20. Kit OI, Trifanov VS, Petrusenko NA, Gvaldin DY, Kutilin DS, Timoshkina NN. Identification of new candidate genes and signalling pathways associated with the development of neuroendocrine pancreatic tumours based on next generation sequencing data. *Mol Biol Rep.* 2020; 47 (6): 4233–43.
21. Kit OI, Vodolazhskij DI. Molekuljarnaja biologija kolorektal'nogo raka v klinicheskoj praktike. *Molekuljarnaja biologija.* 2015; 49 (4): 531–54. Russian.