

В.В. Делекторская, Н.Е. Кушлинский

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Российская Федерация

Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологический спектр и клеточная пролиферация (индекс Ki67)

Обзор посвящен анализу современных представлений о различных типах нейроэндокринных новообразований пищеварительной системы человека. В нем обобщены сведения об особенностях последних гистологических классификаций и критериях морфологической диагностики с учетом гистологических, ультраструктурных и иммуногистохимических параметров. Обсуждаются вопросы номенклатуры, а также системы градации и стадирования. В свете этих критериев также представлены данные собственных исследований по клинической значимости определения пролиферативной активности клеток первичных и метастатических нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы на основе оценки экспрессии антигена Ki67.

Ключевые слова: нейроэндокринная опухоль, желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа, дифференцировка, клеточная пролиферация, степень злокачественности.

28

Морфологический и биологический спектр нейроэндокринных опухолей пищеварительной системы

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) пищеварительной системы объединяют широкий спектр относительно редких эпителиальных новообразований, которые могут возникать в различных отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и поджелудочной железе (ПЖ) и обладают общей способностью синтезировать биологически активные вещества и пептидные гормоны. Эти опухоли представляют собой наиболее распространенную группу новообразований из клеток с нейроэндокринным фенотипом и составляют более 60% нейроэндокринных неоплазий всех анатомических локализаций [1–7].

Нейроэндокринные новообразования были впервые описаны в конце XIX в., но особенности их развития, течения и «биологического поведения» остаются предметом многочисленных дискуссий до настоящего времени [2, 7–10]. Открытие Н.К. Кульчицким в 1897 г. энтеромаффинных клеток в эпителии тонкой кишки положило начало изучению диффузной нейроэндокринной систе-

мы [11]. Опухоли из клеток данной системы определяли термином «карциноид», который впервые предложил S. Oberndorfer в 1907 г. для описания медленно протекающих, напоминающих карциному, опухолей тонкой кишки [12]. Длительное время этот термин применяли для обозначения всех неоплазий с нейроэндокринной морфологией, вкладывая в него смысл доброкачественного поведения [13].

Использование достижений современных иммуногистохимических и молекулярно-биологических технологий позволило на протяжении последних десятилетий в определенной степени расширить общепринятые взгляды на природу нейроэндокринных новообразований, при этом произошла значительная эволюция в подходах к номенклатуре и оценке злокачественного потенциала опухолей данного типа.

Согласно современным представлениям, все нейроэндокринные новообразования обладают биологическим потенциалом злокачественности, но при этом клиническое поведение может варьировать от медленного, индолентного течения, которое не сопровождается в течение многих лет развитием метастазов и рецидивов опухоли,

V.V. Delektorskaya, N.E. Kushlinskii

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre of RAMS, Moscow, Russian Federation

Neuroendocrine Tumors of Digestive System: Morphologic Spectrum and Cell Proliferation (Ki67 index)

This review deals with the analysis of up-to-date concepts of different types of human neuroendocrine tumors of the digestive system. It summarizes the information on the specifics of recent histological classifications and criteria of morphological diagnosis accounting histological, ultrastructural and immunohistochemical parameters. Current issues of the nomenclature as well as various systems of grading and staging are discussed. In the light of these criteria the results of the own research clinical value of the determination of cell proliferation in primary and metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms on the basis of evaluation of the Ki67 antigen expression are also presented.

Key words: neuroendocrine tumor, gastrointestinal tract, pancreas, differentiation, cell proliferation, grade.

до быстро прогрессирующих высокоагрессивных вариантов заболевания [4, 5, 14]. Для точной диагностики, оценки прогноза и выбора адекватной терапии НЭО необходимы четкие базовые установки для классификации этих опухолей в процессе морфологического исследования, включая общепринятые критерии стадирования и определения степени злокачественности на основании оценки пролиферативной активности опухолевых клеток.

Рациональный подход к номенклатуре НЭО пищеварительной системы обеспечила классификация экспертов Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization, WHO), опубликованная в 2000 г., в которой впервые была представлена обоснованная терминология и прогностическая стратификация данного типа неоплазий [15]. С учетом того, что общепризнанный термин «карциноид» не мог в полной мере охватить весь спектр нейроэндокринных новообразований ЖКТ и ПЖ, в классификации (WHO, 2000) он был заменен более общими определениями «эндокринная опухоль» и «эндокринный рак» [15]. Была предложена единая схема классификации для всех эндокринных опухолей ЖКТ и ПЖ, выделяющая 3 основных типа новообразований независимо от места их развития. Кроме того, для оценки дифференцировки НЭО ввели 2 категории, разделяющие высоко- и низкодифференцированные опухоли, значительно отличающиеся по своему клиническому течению. Старые классификации нейроэндокринных неоплазий ЖКТ и ПЖ (WHO; 2000, 2004) определяли морфологические различия между эндокринными опухолями с «доброкачественным» биологическим поведением (группа 1a) и с неопределенным потенциалом злокачественности (группа 1б), а также эндокринным раком, демонстрирующим низкую (группа 2) и высокую (группа 3) степень злокачественности (табл. 1) [3, 15, 16].

Данная классификация разработала критерии для практического использования, однако ее применение было ограничено необходимостью встраивать информацию, относящуюся к стадированию, в систему определения степени злокачественности опухоли, основанную на оценке клеточной пролиферации.

В дальнейшем Европейское общество по изучению нейроэндокринных опухолей (European Neuroendocrine Tumor Society, ENETS) разработало 2 дополняющие друг друга классификации НЭО ЖКТ и ПЖ: систему определения степени злокачественности (Grade, G) и систему TNM-стадирования по локализациям [17]. Другой вариант TNM-классификации НЭО ЖКТ и ПЖ был предложен Американским объединенным комитетом по онкологии (American Joint Committee on Cancer, AJCC) и включен в 7-ю редакцию Руководства по определению стадий злокачественных опухолей. В системах TNM-стадирования ENETS (2006) и UICC/AJCC (2009) использованы общепринятые показатели, которые совпадают для большинства отделов ЖКТ, но имеют существенные отличия для НЭО ПЖ и аппендикса.

В настоящее время для практического использования в процессе морфологической диагностики НЭО ЖКТ и ПЖ применяют классификацию WHO, опубликованную в 2010 г., в которую вошли установленные ранее критерии определения степени злокачественности (ENETS, 2007) и TNM-стадирования (AJCC, 2009) [18].

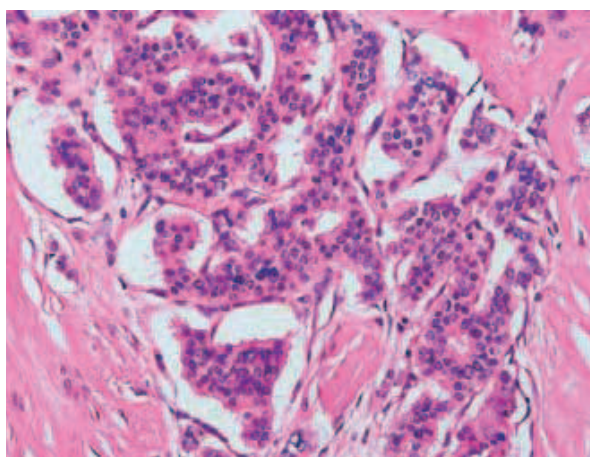
Для определения широкого морфологического и биологического спектра опухолей диффузной нейроэндокринной системы ЖКТ и ПЖ последняя редакция классификации (WHO, 2010) предлагает стандартные определения «нейроэндокринная опухоль» и «нейроэндокринный рак». Все высококодифференцированные новообразования, независимо от того, ведут ли они себя «доброкачественно» или дают метастазы, обозначают термином «нейроэндокринная опухоль» (neuroendocrine tumor, NET), и они имеют градацию G₁ или G₂. Все низкодифференцированные новообразования называют термином «нейроэндокринный рак» (neuroendocrine carcinoma, NEC), они имеют градацию G₃. В соответствии с классификацией (WHO, 2010), для обозначения всей группы опухолей данного типа предложен термин «нейроэндокринные неоплазии» (neuroendocrine neoplasm, NEN), который объединяет опухоли всех степеней злокачественности (низкой, промежуточной, высокой). Определение «нейроэндокринный» рекомендовано в последней классификации вместо термина «эндокринный» для отражения способности клеток опухолей данного типа экспрессировать белковые маркеры, общие для нервной и эндокринной системы. Термин «карциноид», который был ранее отменен (WHO, 2000) и употреблялся только в контексте карциноидного синдрома, в новой классификации (WHO, 2010) применяется как синоним всех высококодифференцированных НЭО ЖКТ, имеющих низкую степень злокачественности (NET G₁) [16, 18]. В табл. 1 приведено сравнение номенклатуры и типов НЭО в соответствии со старой и новой схемой классификации [15, 18].

Таким образом, и старая, и новая классификации НЭО выделяют 2 степени дифференцировки новообразований.

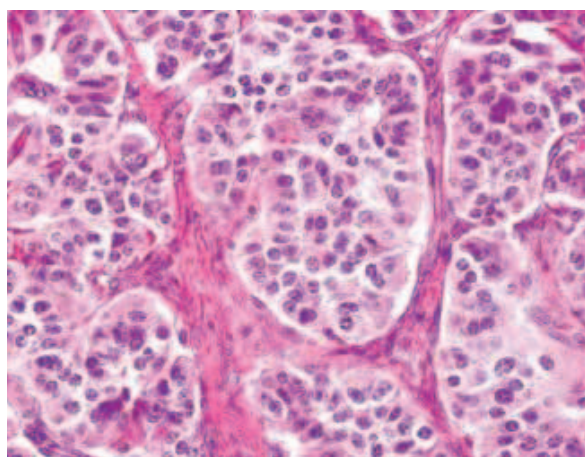
Высокодифференцированные НЭО (G₁ и G₂) демонстрируют типичную, хорошо организованную гистологическую структуру: органоидную, трабекулярную, альвеолярную или инсулярную модель строения с тонкой фиброваскулярной стромой, разграничивающей гнезда опухолевых клеток, которые иногда формируют цепочки, структуры типа периферических «палисадов» и «розеток» (рис. 1a). Опухоль построена однотипными клетками округлой или овальной формы с эозинофильной, умеренно развитой цитоплазмой и круглыми ядрами с незаметными ядрышками и характерным гранулярным хроматином типа «salt & pepper» (рис. 1б). Эти опухоли могут демонстрировать целый спектр вариантов гистологического строения, включая веретенноклеточный, папиллярный, онкоцитарный, светлоклеточный, муцин-се-

Таблица 1. Старая и новая классификация нейроэндокринных опухолей пищеварительной системы

| WHO, 2000 | WHO, 2010 |
|--|---|
| Высокодифференцированная эндокринная опухоль: а) доброкачественная б) с неопределенным потенциалом злокачественности | Нейроэндокринная Опухоль Grade 1 (карциноид) |
| Высокодифференцированный эндокринный рак низкой степени злокачественности | Нейроэндокринная опухоль Grade 2 |
| Низкодифференцированный эндокринный рак высокой степени злокачественности | Нейроэндокринный рак Grade 3 -мелкоклеточный тип -крупноклеточный тип |



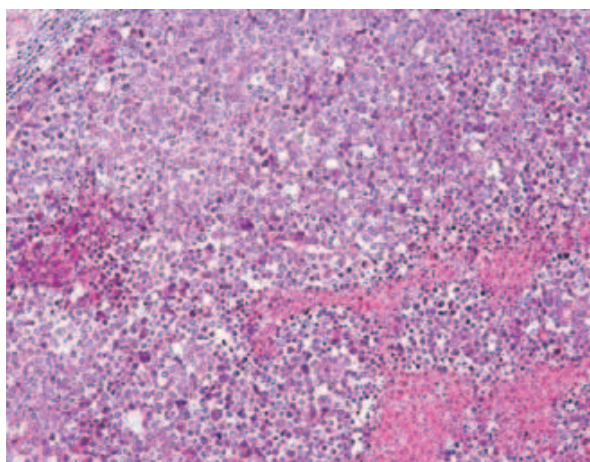
а



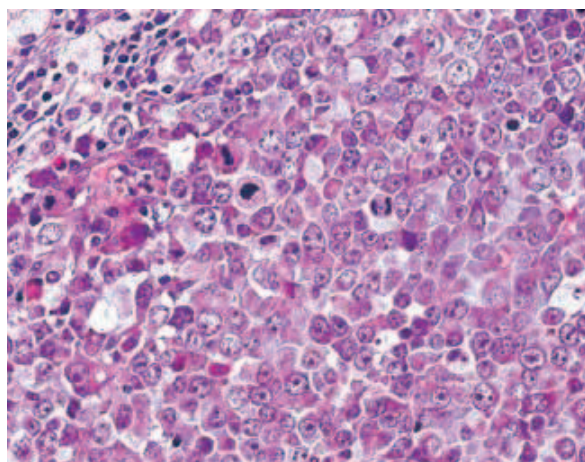
б

Рис. 1. Высоккодифференцированная НЭО поджелудочной железы: а. Опухоль состоит из мелких однотипных клеток, формирующих альвеолярные структуры (×400). б. Ядра клеток содержат характерный зернистый хроматин (×600). Окраска гематоксилином и эозином.

30



а



б

Рис. 2. Низкодифференцированный нейроэндокринный рак: а. Мелкоклеточный рак пищевода (×400). б. Крупноклеточный нейроэндокринный рак толстой кишки (×600). Окраска гематоксилином и эозином.

кретирующий, пигментный (меланин-секретирующий), с образованием в строме хряща, кости, гиалина, амилоида и другие варианты дифференцировки.

Категория низкодифференцированного нейроэндокринного рака (G_3) включает новообразования, которые классифицируют как мелко- и крупноклеточные типы. Мелкоклеточный рак состоит из мелких однотипных клеток округлой, овальной или вытянутой формы со скудной цитоплазмой и нечеткими клеточными границами (рис. 2а). Ключевым диагностическим признаком является вид ядер, содержащих характерный нежный хроматин и незаметные ядрышки. Зоны диффузного роста опухоли иногда могут сочетаться с типичными карциноидными структурами. Для опухоли характерны обширные зоны некроза и высокая митотическая активность. Морфологический диагноз базируется преимущественно на оценке гистологических особенностей опухоли, которые выявляются на светооптическом уров-

не при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Крупноклеточный нейроэндокринный рак построен из клеток крупного/промежуточного размера с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, значительной ядерной атипией; опухоль сохраняет нейроэндокринную морфологию, содержит мультифокальные или комедоподобные некрозы, большое число митозов (рис. 2б). Для подтверждения диагноза необходимо продемонстрировать положительную экспрессию как минимум одного НЭ-маркера и/или наличие нейросекреторных гранул при электронно-микроскопическом исследовании [1, 4].

В спектре НЭ-новообразований присутствует очень сложный и противоречивый тип опухолей с сочетанием нейроэндокринных и ненейроэндокринных популяций клеток. В пищеварительном тракте эти опухоли группируют под термином «смешанный аденонейроэндокринный рак» (WHO, 2010) [18]. Четкие диагностические при-

знаки и критерии оценки биологического поведения этих опухолей остаются во многом неясными.

Отдельные специфичные по локализациям классификации НЭО пищеварительной системы (WHO, 2010) отражают анатомические и функциональные особенности конкретного органа: пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, подвздошной кишки, червеобразного отростка, толстой кишки, ПЖ [18]. Важно подчеркнуть значение конкретной первичной локализации неоплазии, поскольку место развития определяет разный прогноз течения определенных типов НЭО пищеварительной системы.

Нейроэндокринные неоплазии ЖКТ и ПЖ различаются по функциональной активности и спектру продуцируемых гормонов. Также они могут быть одним из проявлений наследственных синдромов, например синдрома множественной эндокринной неоплазии (MEN-1). Функционирующие НЭО наиболее часто наблюдаются в ПЖ, при этом чаще всего встречаются такие типы, как инсулинома и гастринома, а к редким разновидностям относятся VIPома, глюкагонома, соматостатинома, опухоль из PP-клеток. Эти опухоли сопровождаются развитием гормональных синдромов, что облегчает их диагностику. Нефункционирующие НЭО обычно обнаруживают на более поздних стадиях заболевания и, несмотря на отсутствие клинических симптомов гормональной гиперсекреции, они могут демонстрировать иммуногистохимическую позитивность к различным гормонам [16, 19, 20].

Для того чтобы далее стратифицировать НЭО гастроэнтеропанкреатической системы в отношении прогноза их течения, новообразования классифицируют в соответствии с системами определения Grade и TNM-стадирования (WHO/ENETS/AJCC, 2010) [16, 18]. Дополнительными критериям оценки прогноза являются данные о наличии инвазии кровеносных и лимфатических сосудов, нейроинвазии, участков некроза.

Таким образом, морфологическая диагностика широкого спектра НЭО ЖКТ и ПЖ включает 3 основных этапа (определение гистологической дифференцировки, Grade и стадии), которые обеспечивают взаимодополняющую информацию и являются обязательными.

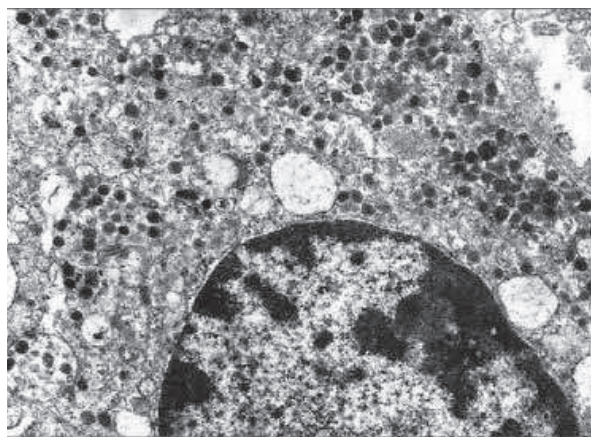
Ультраструктура, иммунофенотип и молекулярно-биологические особенности нейроэндокринных опухолей

Несмотря на то, что нейроэндокринные новообразования ЖКТ и ПЖ образуют крайне разнородную группу в отношении биологического поведения и клинических проявлений, они демонстрируют сходные ультраструктурные и иммуногистохимические (ИГХ) особенности [2, 4, 21, 22].

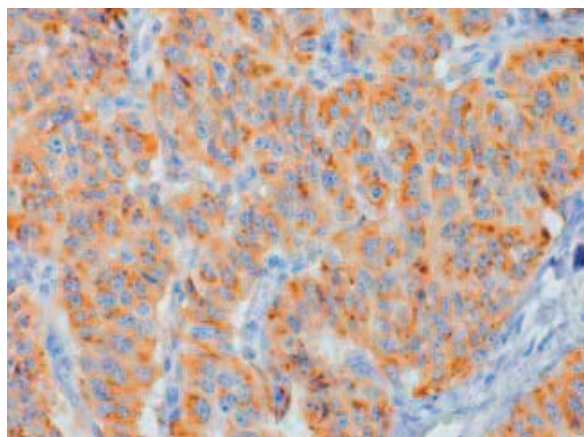
Ультраструктурный фенотип всех подтипов НЭО определяет присутствие в цитоплазме клеток электронноплотных секреторных гранул (Large Dense Core Vesicles, LDCV) и мелких пузырьков с нейротрансмиттерами (Synaptic-Like Micro Vesicles, SLMV), которые ассоциированы с рядом секреторных продуктов (рис. 3а) [4]. Электронно-микроскопическое исследование в настоящее время рекомендуется выполнять в сложных дифференциально-диагностических случаях, когда число гранул в цитоплазме опухолевых клеток недостаточно для достижения порога чувствительности при ИГХ-определении, что наиболее ценно для выявления нейроэндокринной дифференцировки в низкодифференцированных и комбинированных опухолях.

ИГХ-анализ позволяет подтвердить диагноз, различить отдельные подтипы НЭО, уточнить гормональный статус, а также определить место развития первичной опухоли при исследовании метастазов без установленного первичного очага [21–23].

В настоящее время морфологическая диагностика НЭО любого отдела пищеварительной системы невозможна без определения экспрессии ИГХ-маркеров НЭ-дифференцировки. Два основных общих НЭ-маркера (рис. 3б) рекомендованы для обязательного использования: хромогранин А — один из наиболее характерных неспецифических маркеров, связанный с плотными гранулами (LDCV), и синаптофизин — маркер мелких везикул (SLMV). Важно отметить, что экспрессия хромогранина А может варьировать или отсутствовать в низкодифференцированных нейроэндокринных новообразованиях, при этом наличие синаптофизина обязательно для постановки диагноза НЭО. Гормоны, определяющие специфический тип секреции клеток опухоли, в отличие



а



б

Рис. 3. Высокодифференцированная НЭО G2: а. Электронно-микроскопическое исследование. Плотные гранулы в цитоплазме опухолевой клетки ($\times 10\,000$). б. Иммуногистохимическое исследование. Диффузная экспрессия хромогранина А в виде гранулярного окрашивания цитоплазмы. Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера ($\times 400$).

от хромогранина А и синаптофизина, не относятся к факторам, которые нужно обязательно выявлять при ИГХ-исследовании нейроэндокринных неоплазий.

Мембранный рецептор молекул нейроадгезии CD56 (NCAM), а также маркеры цитоплазматических протеинов — нейронспецифическая энолаза (NSE) и PGP9.5 — обладают высокой чувствительностью, но не являются достаточно специфичными и не рекомендованы для рутинного использования в диагностике НЭО. Важно отметить, что CD56 рассматривают как наиболее чувствительный НЭ-маркер для мелкоклеточного рака, однако, учитывая его низкую специфичность, интерпретировать ИГХ-данные всегда следует в контексте соответствующей морфологической структуры опухоли [2, 21].

Для подтверждения метастазов эпителиальной природы НЭО используют ИГХ-окрашивание на кератины. Большинство нейроэндокринных неоплазий демонстрирует положительную экспрессию при окрашивании антителами к панцитокератину (AE1/AE3) и антителами к низкомолекулярным цитокератинам (CK8, CK18, CAM 5.2) [21, 22].

При исследовании метастазов высококодифференцированных НЭО без выявленного первичного очага с диагностической целью рекомендовано 2 основных ИГХ-маркера: CDX2 и TTF1 (Thyroid Transcription Factor 1) [2, 21, 24–26]. При помощи данных транскрипционных факторов можно различить наиболее частые первоисточники метастатических опухолей, а именно: ЖКТ/ПЖ и легкое [27]. В ряде последних работ представлены диагностические маркеры, которые дают возможность дифференцировать первичные опухоли органов ЖКТ и ПЖ: ISL1, PDX1, PAX-6 и NESP55 [21, 28, 29]. ИГХ-верификация отдельных специфических пептидных гормонов также может оказаться полезной для определения первичной локализации опухоли.

Индекс пролиферативной активности клеток Ki67 (клон MIB-1), как указывалось выше, относится к числу параметров, которые утверждены международными организациями для определения степени злокачественности НЭО пищеварительной системы (WHO, 2010) [16, 21, 30, 31].

Таким образом, оптимальная панель ИГХ-окрасок для диагностики высококодифференцированных НЭО включает хромогранин А, синаптофизин и Ki67 (MIB-1), в то время как диагностика низкокодифференцированных вариантов часто требует более широкой панели маркеров, в которую входят окраски с помощью антител к кератинам, хромогранину А, синаптофизину, CD56, CDX-2, TTF-1 и Ki67 (MIB-1).

Молекулярный профиль НЭО ЖКТ и ПЖ служит предметом многочисленных исследований, направленных на выявление признаков, полезных для более точной диагностики, оценки прогноза и терапии этой категории неоплазий [2, 6, 9, 16]. Для лечения нейроэндокринных новообразований пищеварительной системы ведется активный поиск новых препаратов направленного действия. К числу перспективных маркеров, характеризующих чувствительность НЭО к специфическому лечению, относят рецепторы соматостатина (SSTR), молекулы пу-

тей сигнальной трансдукции P13K/PAkt/mTOR, метилгуанин-DNA-метилтрансферазу (MGMT) и ряд других факторов [5, 14].

Данные о зависимости между молекулярным профилем опухоли и ответом на лечение в настоящее время только накапливаются. Тем не менее очевидно, что в ближайшем будущем будут усовершенствованы методы определения специфических молекулярно-биологических характеристик НЭО, и эта информация приобретет важное практическое значение.

Степень злокачественности и определение пролиферативной активности клеток первичных опухолей и их метастазов

Заболеваемость НЭО ЖКТ и ПЖ значительно увеличилась в последние десятилетия, при этом многие случаи протекают бессимптомно, диагностируются на поздних стадиях и характеризуются наличием метастазов при первичной диагностике [10, 31, 32]. Определение биологического потенциала злокачественности НЭО — наиболее сложная диагностическая проблема.

В соответствии с современными представлениями, отраженными в классификациях (WHO/ENETS/AJCC 2010) [17, 18], различная степень злокачественности нейроэндокринных неоплазий (Grade, G₁, G₂, G₃) основана на оценке данных гистологического исследования и определении пролиферирующей фракции (уровня митотической активности и индекса Ki67) (табл. 2).

Ключевым моментом является подсчет числа митозов в 50 полях зрения при большом увеличении микроскопа (High Power Fields, HPF) и определение индекса Ki67 (клон MIB-1) как процента окрашенных ядер при учете 2000 опухолевых клеток в областях наибольшей пролиферативной активности. Результат выражают как среднее число митозов в 10 HPF (или 2 мм²) и средний процент окрашенных ядер опухолевых клеток (индекс Ki67).

В настоящее время признано, что лучшим методом оценки индекса Ki67 является визуальный подсчет числа окрашенных ядер (несмотря на определенную субъективность результатов), т.к. методы компьютерной оценки пока не являются доступными для рутинного использования в большинстве лабораторий [33–38].

Важно подчеркнуть, что определение пролиферативной активности опухолевых клеток путем подсчета индекса Ki67 — это необходимое условие современной морфологической диагностики, которое служит базой для дальнейшей клинической оценки агрессивности течения заболевания и обоснованного назначения соответствующих режимов лекарственного лечения [16, 32, 39, 40]. Данный показатель достоверно коррелирует с выживаемостью больных НЭО и является ключевым в выборе вариантов био- и химиотерапии [14, 30, 34–36].

Несмотря на достоверное прогностическое значение современных классификаций НЭО пищеварительной системы, риск метастатического распространения опухолевого процесса пока трудно четко установить, и более

Таблица 2. Система определения Grade (WHO/ENETS/AJCC)

| Grade | Число митозов, ×10 HPF (2 мм ²) | Индекс Ki67, % |
|----------------|---|----------------|
| G ₁ | <2 | ≤2 |
| G ₂ | 2–20 | 3–20 |
| G ₃ | >20 | >20 |

Примечание. HPF — поле зрения при большом увеличении микроскопа, high power field (×400).

Таблица 3. Распределение случаев нейроэндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы по анатомической локализации, полу, возрасту и степени злокачественности (Grade)

| Анатомическая локализация | N, абс. (%) | M, абс. (%) | Ж, абс. (%) | Возраст (средний) | Grade G ₁ , абс. (%) | Grade G ₂ , абс. (%) | Grade G ₃ , абс. (%) |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Пищевод | 1 (0,6) | 1 (100) | - | 61 | - | - | 1 (100) |
| Желудок | 20 (13,5) | 10 (50) | 10 (50,0) | 18–71 (54) | 8 (40) | 10 (50) | 3 (15) |
| Поджелудочная железа | 72 (48,6) | 35 (48,6) | 37 (51,4) | 16–79 (53,7) | 15 (20,8) | 49 (68,1) | 8 (11,1) |
| Двенадцатиперстная кишка | 8 (5,4) | 4 (50) | 4 (50) | 42–61 (50) | 1 (12,5) | 7 (87,5) | - |
| Тонкая кишка | 20 (13,5) | 4 (20) | 16 (80) | 24–67 (58,1) | 1 (5) | 15 (75) | 4 (20) |
| Аппендикс | 2 (1,4) | 1 (50) | 1 (50) | 50–78 (64) | 1 (50) | 1 (50) | - |
| Ободочная кишка | 9 (6,1) | 2 (22,2) | 7 (77,8) | 39–59 (50,2) | 2 (22,2) | 5 (55,6) | 2 (22,2) |
| Прямая кишка | 7 (4,7) | 6 (85,7) | 1 (14,3) | 36–67 (54) | - | 6 (85,7) | 1 (14,3) |
| Желудочно-кишечный тракт, без выявленного первичного очага (метастазы в печени) | 9 (6,1) | 4 (44,4) | 5 (55,6) | 18–69 (49,8) | 1 (11,1) | 6 (66,7) | 2 (22,2) |
| Всего: | 148 (100) | 67 (45,2) | 81 (54,7) | 16–78 (52,5) | 57 (36,3) | 77 (49,0) | 23 (14,7) |

Примечание: N – количество случаев, M – мужчины, Ж – женщины, абс. – абсолютное значение.

50% неоплазий представлено метастатической болезнью [10, 35, 39, 40]. Метастатические формы НЭО ЖКТ и ПЖ демонстрируют значительное разнообразие вариантов клинического течения и требуют не только хирургического, но и эффективного медикаментозного лечения [14, 41]. Морфологическая диагностика послеоперационного материала и биопсий печени позволяет подтвердить диагноз, однако оценка прогноза и возможностей лекарственной терапии во многом зависит от точного определения показателя пролиферативной активности. Вместе с тем в ряде работ отмечают гетерогенность распределения Ki67-позитивных опухолевых клеток и вероятность изменения данного параметра в метастазах по сравнению с исходной опухолью [31, 35, 42].

Цель исследования, проведенного в лаборатории гистохимии и электронной микроскопии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, состояла в изучении ключевых морфологических характеристик первичных и метастатических НЭО пищеварительной системы, оперированных в период между 1994 и 2011 г., и их оценке в соответствии с критериями современной классификации (WHO, 2010). Для изучения клинической значимости определения пролиферативной активности и соответствующей степени злокачественности НЭО проводили ИГХ-исследование экспрессии антигена Ki67, который оценивали на основании подсчета числа окрашенных ядер опухолевых клеток в первичной опухоли и метастазах в лимфатических узлах и печени.

Группа НЭО пищеварительной системы, отобранная в результате поиска в базе данных отдела патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН за 18-летний период (1994–2011), включала 207 больных (в 148 случаях операционный материал был доступен для морфологического исследования).

Диагноз в каждом случае был подтвержден на основе пересмотра гистологических препаратов первичных и/или метастатических опухолей и информации, полученной из морфологического заключения. Изучены такие факторы, как размер первичной опухоли, степень гистологической дифференцировки, степень злокачественности (Grade), местная инвазия и прорастание окружающих органов, наличие внутрисосудистой и периневральной инвазии, очагов некроза, регионарных и отдаленных метастазов.

Во всех наблюдениях нейроэндокринная природа опухоли была подтверждена с помощью ИГХ-окраски с антителами к хромогранину А и синаптофизину. Гра-

дация опухолей проводилась на основании оценки митотической активности и индекса Ki67 в соответствии с критериями классификации WHO [18].

ИГХ-окрашивание выполнено на серийных парафинновых срезах ткани первичных и/или метастатических опухолей с использованием антител к Ki67 (MIB-1), хромогранину А, синаптофизину (Dako, Дания) и системы детекции «Super Sensitive™ Polymer-HRP» (BioGenex, США). Депарафинизированные срезы обрабатывали в цитратном буфере pH 6.0 в водяной бане при 95 °С в течение 40 мин. Результаты экспрессии хромогранина А и синаптофизина оценивали с учетом интенсивности окраски и числа антиген-позитивных клеток. Индекс Ki67 выражали как процент положительно окрашенных ядер опухолевых клеток в зонах наибольшей пролиферативной активности при учете 2000 клеток.

Всего исследовано 148 наблюдений НЭО различных отделов пищеварительной системы: 1 (0,6%) случай НЭО пищевода, 20 (13,5%) — НЭО желудка, 72 (48,6%) — НЭО ПЖ, 8 (5,4%) — НЭО двенадцатиперстной кишки, 20 (13,5%) — НЭО тощей и подвздошной кишки, 2 (1,4%) — НЭО аппендикса, 9 (6,1%) — НЭО ободочной кишки, 7 (4,7%) — НЭО прямой кишки, 9 (6,1%) — метастазы в печени НЭО ЖКТ без выявленного первичного очага. Распределение больных НЭО по полу, возрасту и степени злокачественности в зависимости от анатомической локализации опухоли представлено в табл. 3.

В данной статье мы представим анализ наиболее многочисленной группы пациентов (72 случая НЭО ПЖ). Возраст больных на период диагностики составил от 16 до 79 лет (средний возраст 53,7 года). Соотношение мужчин и женщин — 0,95 (35 мужчин и 37 женщин). Размер опухолей варьировал от 0,3 до 16 см (средний 2,5 см). В 33 (45,8%) случаях опухоль локализовалась в головке, в 17 (23,7%) — в теле, в 22 (30,5%) — в хвосте ПЖ. Множественное поражение ПЖ отмечено у 4 (5,6%) пациентов. В 11 (15,3%) случаях диагностированы функционирующие и в 61 (84,7%) — нефункционирующие НЭО ПЖ.

На момент постановки диагноза у 35 (48,6%) больных была зарегистрирована локализованная форма болезни без регионарных и/или отдаленных метастазов (стадия IA, IB и IIA), у 11 (15,3%) пациентов обнаружено регионарное распространение (стадия IIB), у 26 (36,1%) больных заболевание сопровождалось наличием отдаленных метастазов в печени (стадия IV). Общий период послеоперационного наблюдения составил от 6 мес до 17 лет. За период наблюдения умерло 10 (13,8%) пациентов. У 17 (23,6%) больных

были выявлены метакронные опухолевые очаги в печени, у 4 (5,6%) — метастазы в легком, надпочечнике, почке и позвонках, у 2 (2,8%) — в отдаленных лимфатических узлах, у 3 (4,2%) — местные рецидивы заболевания в разные сроки после хирургического лечения.

В результате клинко-морфологического анализа новообразования были классифицированы в 70 (97,2%) случаях как высокодифференцированные НЭО и только в 2 (2,78%) наблюдениях — как низкодифференцированный рак мелкоклеточного типа. Метастазы в печени были морфологически верифицированы у 32 (44,4%) и в лимфатических узлах — у 26 (36,1%) из 72 обследованных.

Пролиферативная активность клеток НЭН ПЖ, определенная путем подсчета индекса Ki67 (MIB-1), в первичных опухолях варьировала от 1 до 70% позитивно окрашенных ядер опухолевых клеток. Критерий G (Grade), определяющий гистологическую степень злокачественности НЭО [17], был расценен в первичных опухолях в общей группе как G₁ у 15 (20,8%), G₂ — у 52 (72,2%), G₃ — у 5 (6,9%) больных.

Индекс Ki67 (MIB-1) параллельно с первичной опухолью был определен в 30 синхронных и метакронных метастазах высокодифференцированных НЭО ПЖ (G₁ и G₂) в печени, а также в повторных метастазах тех же опухолей. Средний индекс Ki67 в группе НЭО ПЖ без метастазов составил 5,7%, в группе НЭО ПЖ с метастазами в печени — 13,4% и в метастазах в печени — 15,0%. Изменение уровня пролиферативной активности клеток в метастазах по сравнению с первичной опухолью отмечено в 12 (36,4%) случаях. Из них в 9 (27,3%) наблюдениях пролиферативная активность в метастазах возрастала в 2–4 раза по сравнению с соответствующей первичной опухолью.

В случаях НЭО ПЖ, имеющих градацию G₁, метастазы в печени выявлены у 4 (5,6%) больных. При этом в 2 случаях значения Ki67 в метастатических опухолях совпадали с таковыми в первичных очагах и не превышали 1 и 2% позитивно окрашенных ядер опухолевых клеток, а в 2 случаях увеличились до 9% и соответствовали градации G₂. В процессе опухолевой прогрессии в одном из этих наблюдений значения Ki67 в 2 метакронных метастазах, диагностированных через 1 год и 9 лет после хирургического удаления первичной опухоли, возросли до 3

и 9%, соответственно. Средний индекс Ki67 в группе НЭО G₁ без метастазов составил 1,7%, с метастазами в печени — 1,9%, в метастазах в печени — 4,8%.

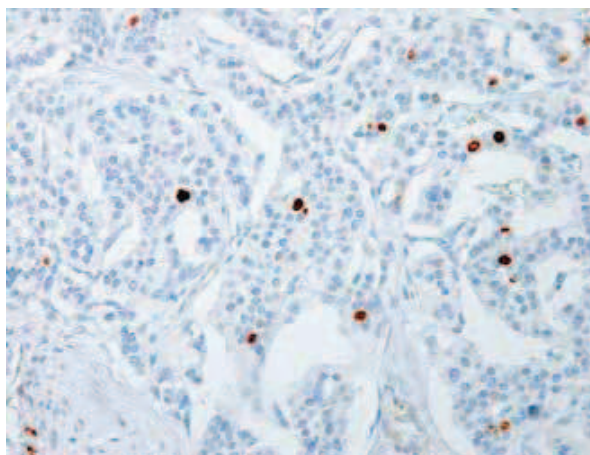
Следует отметить, что способность НЭО G₁ метастазировать в печень, а также низкая пролиферативная активность клеток части метастазов этих опухолей (Ki67 = 1–2%) свидетельствуют о необходимости поиска дополнительных критериев для оценки злокачественного потенциала НЭО ПЖ. С другой стороны, полученные данные демонстрируют вероятность увеличения величины Ki67 в метастазах НЭО G₁, что необходимо учитывать при оценке степени злокачественности новообразования ПЖ (низкая G₁/промежуточная G₂) и выборе соответствующего варианта дополнительной лекарственной терапии.

С учетом гистологической и ИГХ-картины, а также уровня пролиферативной активности опухолевых клеток большинство исследованных неоплазий ПЖ были расценены как высокодифференцированные НЭО G₂. Метастазы в печени опухолей, имеющих градацию G₂, обнаружены у 23 (31,9%) больных. Значения Ki67 в первичных опухолях и метастазах совпадали в 16 случаях, составляя от 3 до 20% положительно окрашенных ядер клеток. В 7 случаях значения Ki67 возросли в 2,5–3,5 раза в синхронных и метакронных метастазах в печени: с 6–8% в первичной опухоли до 18–20% в синхронных и 27–30% в метакронных вторичных очагах опухолевого роста (рис. 4а, б). Средний индекс Ki67 в группе НЭО G₂ без метастазов составил 9,7%, с метастазами в печени — 12,6%, в метастазах в печени — 15,9% (табл. 4).

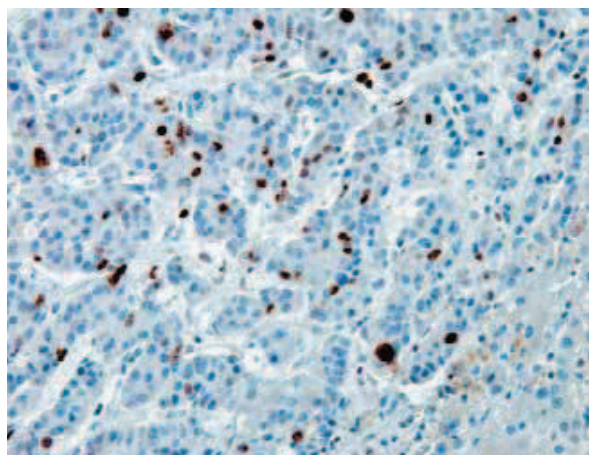
Важно подчеркнуть, что в 4 случаях НЭО G₂ индекс Ki67 в метастазах в печени, сохраняющих типичную морфологию высокодифференцированных НЭО, превысил 20%, и по числу Ki67-позитивных ядер эти неоплазии соответствовали градации G₃. Данные наблюдения были выделены в отдельную морфологическую группу НЭО G₃. В эту же группу были включены еще 3 наблюдения метастатических НЭО ПЖ, в которых первичные неоплазии и их метастазы в печени обладали высокодифференцированной гистологической структурой и демонстрировали одинаковый индекс пролиферативной активности, превышающий 20% пороговый уровень (от 25 до 30%).

По результатам проведенного исследования была осуществлена оценка степени злокачественности первич-

34



а



б

Рис. 4. Экспрессия Ki67 (MIB-1) в клетках НЭО G₂ поджелудочной железы: а. Индекс пролиферативной активности Ki67 (MIB-1) в клетках первичной опухоли равен 6% (×400). б. Индекс пролиферативной активности Ki67 (MIB-1) в клетках метастаза в печени равен 18% (×400). Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера.

Таблица 4. Индекс Ki67 (среднее значение) в первичных высокодифференцированных нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы и их метастазах в печени

| Тип нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы | Первичные опухоли в общей группе, % | Первичные опухоли без метастазов, % | Первичные опухоли с метастазами, % | Метастазы в печени, % |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| G ₁ | 1,8 | 1,7 | 1,9 | 4,1 |
| G ₂ | 11,5 | 9,7 | 12,6 | 15,9 |
| G ₃ | 25,7 | — | 25,7 | 25,1 |
| Итого: | 12,9 | 5,7 | 13,4 | 15,0 |

ных высокодифференцированных НЭО ПЖ в метастатической группе, которая соответствовала G₁ в 4 (13,3%), G₂ — в 23 (76,7%), G₃ — в 3 (10%) случаях. Индекс Ki67 (MIB-1), определенный параллельно с первичной опухолью в синхронных и метакронных метастазах НЭО ПЖ в печени, позволил изменить степень злокачественности метастатических НЭО ПЖ у 6 пациентов: в 2 случаях — НЭО G₁ на НЭО G₂ и в 4 — НЭО G₂ на НЭО G₃.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что показатель пролиферативной активности клеток первичных НЭО ПЖ нередко меняется в процессе опухолевой прогрессии, при этом синхронные и/или метакронные метастазы в печени могут иметь типичную гистологическую структуру, но не всегда повторяют потенциал злокачественности исходных опухолей. Следует отметить, что в соответствии с предложенным в последнее время делением НЭО на 3 группы (G₁, G₂ и G₃) во вторую группу (G₂) попадают новообразования с очень широким спектром значений индекса Ki67 (от 3 до 20%), клиническое течение и метастатический потенциал которых могут в значительной степени различаться. В ряде работ показано, что наибольшую значимость для оценки клинического течения НЭО G₂ имеет индекс Ki67, превышающий 5% положительно окрашенных ядер опухолевых клеток [34]. В нашем исследовании опухолевая прогрессия, сопровождающаяся значительным увеличением пролиферативной активности клеток в метастазах в печень, чаще всего наблюдалась при показателе Ki67 в первичной опухоли равном 6–8% окрашенных ядер клеток. Кроме того, величина Ki67 >5% в высокодифференцированных НЭО ПЖ достоверно коррелировала с увеличением размера опухоли ($p = 0,014$) и наличием отдаленных метастазов ($p = 0,007$), однако не была связана с наличием внутрисосудистой и местной инвазии ($p = 0,002$), а также метастазов в регионарных лимфатических узлах.

В 2 случаях нейроэндокринного рака ПЖ мелкоклеточного типа (G₃) значения индекса пролиферативной активности Ki67 в клетках первичных опухолей и их синхронных метастазов варьировали от 50 до 70% позитивно окрашенных ядер. Следует отметить, что при значениях Ki67 ≥20% особое внимание необходимо уделять дифференциальной диагностике высокодифференцированных НЭО (G₂₋₃) и нейроэндокринного рака (G₃), что обусловлено тем, что опухоли промежуточной и низкой степени злокачественности значительно отличаются по своим биологическим характеристикам и агрессивности клинического течения [30, 36, 43, 44]. Кроме того, требуется дополнительная характеристика биологических и клинических особенностей группы высокодифференцированных НЭО G₃.

Таким образом, показатель пролиферативной активности опухолевых клеток Ki67 является параметром, который необходимо определять в процессе современной морфологической диагностики при исследовании не только первичных НЭО ПЖ, но и их метастазов с целью уточнения степени злокачественности опухоли

и дальнейшей клинической оценки агрессивности течения заболевания, а следовательно, обоснованного назначения соответствующих режимов лекарственного лечения.

Заключение

Морфологический спектр нейроэндокринных новообразований пищеварительной системы очень сложно объединить в унифицированную концепцию, отражающую особенности биологического поведения различных типов нейроэндокринных неоплазий. В процессе морфологической диагностики наряду с гистологическим анализом НЭО большое значение имеет ИГХ-исследование, которое дает возможность оценить не только экспрессию базовых для постановки диагноза маркеров (хромогранина А и синаптофизина), но и определить уровень пролиферативной активности клеток в первичной и метастатических опухолях. Индекс пролиферативной активности Ki67 рассматривается как один из наиболее важных прогностических критериев, включенных в последнюю гистологическую классификацию WHO-2010 в качестве одного из параметров определения степени злокачественности НЭО пищеварительной системы.

Результаты проведенного исследования показывают, что индекс Ki67 может меняться в ходе опухолевой прогрессии, при этом синхронные и/или метакронные метастазы НЭО в печени, имея типичную высокодифференцированную гистологическую структуру, не всегда повторяют потенциал злокачественности первичных новообразований. Увеличение индекса Ki67 клеток вторичных очагов опухолевого роста в 2–4 раза по сравнению с исходной опухолью, которое отмечено в 27,3% исследованных метастазов НЭО ПЖ в печени, может сопровождаться изменением степени злокачественности (критерия G) новообразования. Кроме того, уровень Ki67, превышающий 5%, достоверно коррелирует с увеличением размера опухоли и наличием отдаленных метастазов НЭО ПЖ.

Таким образом, определение пролиферативной активности клеток в каждом из мест развития опухолевого процесса имеет принципиальное значение в диагностике НЭО. Увеличение уровня экспрессии Ki67 в метастазах по сравнению с первичной опухолью следует расценивать как неблагоприятный фактор риска прогрессии заболевания и учитывать при оценке степени злокачественности новообразования и выборе варианта лекарственного лечения метастатического поражения печени.

Необходимы дальнейшие исследования для совершенствования современной номенклатуры и классификации НЭО пищеварительной системы, а также разработки более специфичных молекулярных маркеров, которые служили бы дополнительными диагностическими, прогностическими показателями и новыми потенциальными мишенями для противоопухолевой терапии.

REFERENCES

1. Anlauf M., Gerlach P., Schott M., Raffel A., Krausch M., Knoefel W.T., Pavel M., Kloppel G. Pathology of neuroendocrine neoplasms. *Chirurg.* 2011; 82 (7): 567–573.
2. Caplin M., Yao J.C. An overview of thoracic and gastrointestinal neuroendocrine tumours. In: M. Caplin, J.C. Yao (eds.). *Handbook of Gastroenteropancreatic and Thoracic Neuroendocrine Tumours. BioScientifica.* 2011. P. 1–9.
3. Kloppel G., Perren A., Heitz P.U. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2004; 1014: 13–27.
4. Kloppel G. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract. Res. Clin. Endocrin. Metabol.* 2007; 21 (1): 15–31.
5. Modlin I.M., Oberg K., Chung D.C., Jensen R.T., de Herder W.W., Thakker R.V., Caplin M., Delle Fave G., Kaltsas G.A., Krenning E.P., Moss S.F., Nilsson O., Rindi G., Salazar R., Ruzniewski P., Sundin A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol.* 2008; 9 (1): 61–72.
6. Oberg K. Carcinoid tumors: molecular genetics, tumor biology, and update of diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Oncol.* 2002; 14: 38–45.
7. Perren A., Schmitt A., Komminoth P., Pavel M. Classification of gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Radiologe.* 2009; 49 (3): 198–205.
8. Rindi G., Bordi C., Rappel S., La Rosa S., Stolte M., Solcia E. Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology, and behavior. *World J. Surg.* 1996; 20 (2): 169–172.
9. Rindi G., Bordi C. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: etiology, molecular pathogenesis and genetics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2005; 19 (4): 519–534.
10. Yao J.C., Hassan M., Phan A., Dagohoy C., Leary C., Mares J.E., Abdalla E.K., Fleming J.B., Vauthey J.N., Rashid A., Evans D.B. One hundred years after «carcinoid»: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. Review. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26 (18): 3063–3072.
11. Kultschizky N. Zur Frage uber den Bau des Darmkanals. *Archiv fur mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte.* 1897; 49: 7–35.
12. Oberndorfer S. Kazinoide tumoren des Dunndarms. *Z. Pathol. Frankf.* 1907; 1: 426–432.
13. Soga J. The term «carcinoid» is a misnomer: the evidence based on local invasion. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009; 28: 15.
14. Oberg K., Jelic S. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: ESMO clinical recommendation for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2009; 20 (Suppl. 4): 150–153.
15. Solcia E., Kloppel G., Sobin L. Histological typing of endocrine tumours, 2nd ed. *WHO, Berlin: Springer.* 2000.
16. Kloppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr. Relat. Cancer.* 2011; 18: 1–16.
17. Rindi G., Kloppel G., Alhman H., Caplin M., Couvelard A., de Herder W.W., Eriksson B., Falchetti A., Falconi M., Komminoth P., Korner M., Lopes J.M., McNicol A.M., Nilsson O., Perren A., Scarpa A., Scoazec J.Y., Wiedenmann B.; all other Frascati Consensus Conference participants; European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS). TNM staging of foregut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* 2006; 449: 395–401.
18. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. In: F.T. Bosman, F.T. Carneiro, R.H. Hrubon et al. (eds.). *IARC Press: Lyon. France.* 2010.
19. Amador Cano A., Garcia F., Espinoza A., Bezies N., Herrera E., De Leija Portilla J. Nonfunctional neuroendocrine tumor of the pancreas: Case report and review of the literature. *Int. J. Surg. Case Rep.* 2013; 4 (2): 225–228.
20. Krampitz G.W., Norton J.A., Poultides G.A., Visser B.C., Sun L., Jensen R.T. Lymph nodes and survival in pancreatic neuroendocrine tumors. *Arch. Surg.* 2012; 147 (9): 820–827.
21. DeLellis R.A., Shin S.J., Treaba O.D. Chapter 10: Immunohistology of Endocrine Tumors. In: D.J. Dabbs (ed.). *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications.* 3rd Edition. *Elsevier Inc.* 2010. P. 291–329.
22. Mertz H., Vyberg M., Paulsen S.M., Teglbjaerg P.S. Immunohistochemical detection of neuroendocrine markers in tumors of the lungs and gastrointestinal tract. *Appl. Immunohistochem.* 1998; 6: 175–180.
23. Krishna M. Diagnosis of metastatic neoplasms: an immunohistochemical approach. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010; 134 (2): 207–215.
24. Kaufmann O., Dietel M. Expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology.* 2000; 36 (5): 415–420.
25. Leteurtre E. Pathologic diagnostic for a primary of metastatic neuroendocrine tumor. *Ann. Pathol.* 2011; 31 (5 Suppl.): 79–80.
26. Marchevsky A.M., Gupta R., Balzer B. Diagnosis of metastatic neoplasms: a clinicopathologic and morphologic approach. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010; 134 (2): 194–206.
27. Sagi A., Alexis D., Remotti F., Bhagat G. Usefulness of CDX2 and TTF-1 in differentiating gastrointestinal from pulmonary carcinoids. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005; 123 (3): 394–404.
28. Schmitt A.M., Riniker F., Anlauf M. Islet 1 (Isl1) expression is a reliable marker for pancreatic endocrine tumors and their metastases. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008; 32 (3): 420–425.
29. Srivastava A., Hornick J.L. Immunohistochemical staining for CDX-2, PDX-1, NESP-55, and TTF-1 can help distinguish gastrointestinal carcinoid tumors from pancreatic endocrine and pulmonary carcinoid tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 2009; 33 (4): 626–632.
30. Dhall D., Mertens R., Bresee C., Parakh R., Wang H.L., Li M., Dhall G., Colquhoun S.D., Ines D., Chung F., Yu R., Nissen N.N., Wolin E. Ki-67 proliferative index predicts progression-free survival of patients with well-differentiated ileal neuroendocrine tumors. *Hum. Pathol.* 2012; 43 (4): 489–495.
31. Klimstra D.S., Modlin I.R., Adsay N.V., Chetty R., Deshpande V., Gonen M., Jensen R.T., Kidd M., Kulke M.H., Lloyd R.V., Moran C., Moss S.F., Oberg K., O'Toole D., Rindi G., Robert M.E., Suster S., Tang L.H., Tzen C.Y., Washington M.K., Wiedenmann B., Yao J. Pathology Reporting of Neuroendocrine Tumors: Application of the Delphic Consensus Process to the Development of a Minimum Pathology Data Set. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; 3 (4, 3): 300–313.
32. Oh T.G., Chung M.J., Park J.Y., Bang S.M., Park S.W., Chung J.B., Song S.Y. Prognostic factors and characteristics of pancreatic neuroendocrine tumors: single center experience. *Yonsei. Med. J.* 2012; 53 (5): 944–951.
33. Adsay V. Ki67 labeling index in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal and pancreatobiliary tract: to count or not to count is not the question, but rather how to count. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36 (12): 1743–1746.
34. Boninsegna L., Panzuto F., Partelli S., Capelli P., Delle Fave G., Bettini R., Pederzoli P., Scarpa A., Falconi M. Malignant pancreatic neuroendocrine tumour: lymph node ratio and Ki67 are predictors of recurrence after curative resections. *Eur. J. Cancer.* 2012; 48 (11): 1608–1615.
35. Couvelard A., Deschamps L., Ravaut P., Baron G., Sauvanet A., Hentic O., Colnot N., Paradis V., Belghiti J., Bedossa P., Ruzniewski P. Heterogeneity of tumor prognostic markers: a reproducibility study applied to liver metastases of pancreatic endocrine tumors. *Mod. Pathol.* 2009; 22 (2): 273–281.

36. Jamali M., Chetty R. Predicting prognosis in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumors: an overview and the value of Ki-67 immunostaining. *Endocr. Pathol.* 2008; 19 (4): 282–288.
37. Remes S.M., Tuominen V.J., Helin H., Isola J., Arola J. Grading of neuroendocrine tumors with Ki-67 requires high-quality assessment practices. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36 (9): 1359–1363.
38. Tang L.H., Gonen M., Hedvat C., Modlin I.M., Klimstra D.S. Objective quantification of the ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36 (12): 1761–1770.
39. Panzuto F., Boninsegna L., Fazio N., Campana D., Pia Brizzi M., Capurso G., Scarpa A., De Braud F., Dogliotti L., Tomassetti P., Delle Fave G., Falconi M. Metastatic and locally advanced pancreatic endocrine carcinomas: analysis of factors associated with disease progression. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29 (17): 2372–2377.
40. Strosberg J., Nasir A., Coppola D., Wick M., Kvols L. Correlation between grade and prognosis in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Hum. Pathol.* 2009; 40 (9): 1262–1268.
41. Palazzo M., Lombard-Bohas C., Cadiot G., Matysiak-Budnik T., Rebours V., Vullierme M.P., Couvelard A., Hentic O., Ruszniewski P. Ki67 proliferation index, hepatic tumor load, and pretreatment tumor growth predict the antitumoral efficacy of lanreotide in patients with malignant digestive neuroendocrine tumors. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 25 (2): 232–238.
42. Yang Z., Tang L.H., Klimstra D.S. Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *Am. J. Surg. Pathol.* 2011; 35 (6): 853–860.
43. Scarpa A., Mantovani W., Capelli P., Beghelli S., Boninsegna L., Bettini R., Panzuto F., Pederzoli P., delle Fave G., Falconi M. Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients. *Mod. Pathol.* 2010; 23 (6): 824–833.
44. Couvelard A. Ki67 and neuroendocrine tumors. *Ann. Pathol.* 2011; 31 (Suppl. 5): 55–56.

CONTACT INFORMATION

Delektorskaya Vera Vladimirovna, PhD, Head of the Histochemistry and Electron Microscopy Laboratory, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS

Address: 115478, Moscow, Kashirskoye Highway 24; **tel.:** (499) 324-61-11; **e-mail:** delektorskaya@yandex.ru

Kushlinskii Nikolai Evgen'evich, PhD, Professor, RAMS cor. member, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS

Address: 115478, Moscow, Kashirskoye Highway 24; **tel.:** (499) 324-11-59; **e-mail:** biochimia@mtu-net.ru