

УДК 616-006.88

ЭКСПРЕССИЯ Ki-67 В ОТДАЛЕННЫХ МЕТАСТАЗАХ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© В.В. Делекторская, Н.А. Козлов, Г.Ю. Чемерис

Ключевые слова: индекс пролиферации опухолевых клеток Ki-67; нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы; первичные опухоли; метастатические опухоли.

Проведен ретроспективный морфологический анализ 72 первичных нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (НЭН ПЖ) и 32 синхронных и метасинхронных метастазов этих опухолей в печени. Целью исследования было определение индекса пролиферации Ki-67 в первичной опухоли и метастазах в печени для выявления клинической значимости изменений пролиферативной активности клеток в процессе опухолевой прогрессии. Результаты исследования показали, что индекс Ki-67, определенный в клетках первичных НЭО ПЖ, увеличивается в 52,0 % вторичных очагов опухолевого роста в 1,7–15 раз, сопровождаясь в ряде случаев изменением степени злокачественности новообразования. Кроме того, в первичных и метастатических опухолях наблюдаются статистически достоверные различия между средними значениями индекса Ki-67 ($p = 0,000$), а также показателями выживаемости больных в зависимости от степени злокачественности первичных и метастатических опухолей ($p = 0,01$ и $p = 0,03$, соответственно). Таким образом, точная и своевременная оценка индекса Ki-67 в метастазах НЭО ПЖ является основой для уточнения степени злокачественности и базой для дальнейшей клинической оценки агрессивности течения заболевания и обоснованного назначения соответствующих режимов лекарственного лечения.

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) поджелудочной железы (ПЖ) характеризуются вариабельными биологическими характеристиками и метастатическим потенциалом [1–3]. Согласно современной классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, 2010), ключевым параметром для определения степени злокачественности опухоли является пролиферативная активность клеток, которая определяется на основе оценки ядерной экспрессии антигена Ki-67 [2, 4–7]. Различают 3 прогностические категории НЭН ПЖ: опухоли низкой (G1), промежуточной (G2) и высокой (G3) степени злокачественности [8–13]. Все высокодифференцированные новообразования, независимо от наличия или отсутствия метастазов, имеют название нейроэндокринная опухоль (НЭО) и градацию G1 (Ki-67 ≤ 2 %) или G2 (Ki-67 3–20 %). Низкодифференцированные новообразования составляют отдельную группу высокоагрессивных опухолей, для обозначения которых используют термин нейроэндокринный рак (НЭР) и градацию G3 (Ki-67 > 20 %).

Учитывая, что более 60 % больных НЭО имеют метастазы на момент постановки диагноза, большое значение для оптимизации лечения имеет определение индекса Ki-67 не только в первичной опухоли, но и во вторичных очагах роста [2, 3, 14–16]. Вместе с тем вероятность изменения пролиферативной активности нейроэндокринных клеток в метастазах НЭО ПЖ в процессе опухолевой прогрессии изучена недостаточно.

Цель настоящего исследования – оценка особенностей экспрессии антигена Ki-67 в клетках метастазов НЭН ПЖ в печени и выявление их связи со степенью злокачественности первичной опухоли и прогнозом заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены клинические данные и материал биопсий 72 больных НЭН ПЖ, прошедших хирургическое лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН» за период с 1994 по 2012 гг. Средний возраст больных на момент диагностики составил 52 года (варьировал от 13 до 79 лет). Соотношение мужчин и женщин было равно 0,67 (29 мужчин и 43 женщины). Первичные опухоли имели размер от 0,3 до 14 см (средний: 2,5 см). В 33 случаях (45,8 %) опухоль локализовалась в головке, в 17 (23,7 %) – в теле, в 22 (30,5 %) – в хвосте ПЖ.

На момент постановки диагноза у 35 (48,6 %) больных наблюдалась локализованная форма болезни без регионарных и/или отдаленных метастазов (стадии IA, IB, IIA), у 12 (16,7 %) пациентов выявляли регионарное распространение (стадия IIB и III), у 25 (34,4 %) больных заболевание сопровождалось наличием регионарных и отдаленных метастазов в печени (стадия IV). Общий период послеоперационного наблюдения составил от 6 месяцев до 17 лет. У 23 (31,9 %) больных отмечалось прогрессирование заболевания в разные сроки после хирургического лечения: у 17 пациентов (23,6 %) были выявлены вторичные опухолевые очаги в печени, у 6 (8,3 %) больных наблюдались местные рецидивы заболевания. За период наблюдения умерло 10 (13,8 %) пациентов.

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание проведено на серийных парафиновых срезах ткани первичных (n 72) и метастатических (n 32) опухолей с использованием антител к Ki-67 (MIB-1), хромогранину A (CgA), синаптофизину (Syn) (фирма «Dako») и системы детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP

(«BioGenex»). Депарафинизированные срезы обрабатывали в цитратном буфере pH 6.0 в водяной бане при 95° С в течение 40 мин. Индекс Ki-67 выражали как процент положительно окрашенных ядер клеток при учете 500–2000 опухолевых клеток в зонах наивысшей пролиферативной активности.

Математический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0 for Windows и Microsoft® Office Access 2007. Достоверность различий частот признаков в изучаемых группах определяли с использованием критерия χ^2 (различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$). Анализ прогностической значимости изучаемых параметров и построение кривых выживаемости проводили методом Каплан–Майера. Достоверность различий в выживаемости оценивали с помощью log-rank теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нейроэндокринная природа первичных и метастатических НЭН ПЖ была подтверждена с помощью положительной ИГХ окраски с антителами к хромогранину А и синаптофизину.

В результате клинко-морфологического анализа 70 (97,2 %) случаев были классифицированы как высокодифференцированные НЭО (G1 и G2) и только 2 (2,7 %) наблюдения – как низкодифференцированный рак (G3) мелкоклеточного типа.

Индекс пролиферативной активности Ki-67 (MIB-I) определен в 72 первичных НЭО ПЖ и 32 синхронных и метастатических метастазах этих опухолей в печени. Градация опухолей проводилась на основании оценки митотической активности и индекса Ki-67 в соответствии с критериями классификации ВОЗ (2010). Пролиферативная активность опухолевых клеток, оцененная с помощью подсчета индекса Ki-67, варьировала от 1 до 70 %. Критерий G (Grade), определяющий гистологическую степень злокачественности НЭН ПЖ, был расценен в первичных опухолях как G1 в 6 (8,3 %), G2 – в 58 (80,5 %), G3 – в 8 (11,2 %) случаях. В 6 наблюдениях новообразования обладали гистологической структурой, характерной для высокодифференцированных опухолей, но при этом демонстрировали уровень пролиферативной активности, равный 25–40 %, соответствующий градации G3. Эти опухоли были выделены в отдельную морфологическую группу НЭО G3. Средние значения индекса Ki-67 в НЭО G1, НЭО G2, НЭО G3 и НЭР составили 3,5, 13,0, 26,3 и 72,5 %, соответственно.

Статистический анализ с применением теста Вилкоксона показал наличие статистически достоверных различий в уровне пролиферативной активности первичных НЭН ПЖ и соответствующих отдаленных метастазов в печени ($p = 0,000$) (рис. 1а, 1б).

Сравнительный анализ образцов первичной опухоли и отдаленных метастазов в печени позволил выявить повышение индекса Ki-67 в 52,0 % вторичных очагов опухолевого роста (13 синхронных и 2 метастатических метастазах). При этом индекс пролиферации в метастазах НЭО ПЖ в печени возрастал в 1,7–15 раз по сравнению с первичной опухолью. Средние значения индекса Ki-67 в первичной опухоли и отдаленных метастазах составили 8,9 и 15,2 %, соответственно.

Отсутствие каких-либо изменений индекса Ki-67 наблюдалось в 8 случаях синхронных и 3 случаях ме-

тахронных метастазов. В 4 синхронных и 1 метастатическом метастазе в печени индекс Ki-67 был ниже, чем в первичной опухоли.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют достоверные отличия показателей пролиферативной активности клеток отдаленных метастазов НЭН ПЖ по сравнению с первичной опухолью и вероятность изменения степени злокачественности новообразования.

Оценка степени злокачественности вторичных очагов НЭО ПЖ показала, что индекс Ki-67 в метастазах НЭО G1 в 3 (21,4 %) случаях достигал 3–15 % и соответствовал промежуточной степени злокачественности (G2) (рис. 2а, 2б). В одном наблюдении НЭО G2 индекс Ki-67 в метастазе возрос до 26 % и соответствовал высокой степени злокачественности (G3).

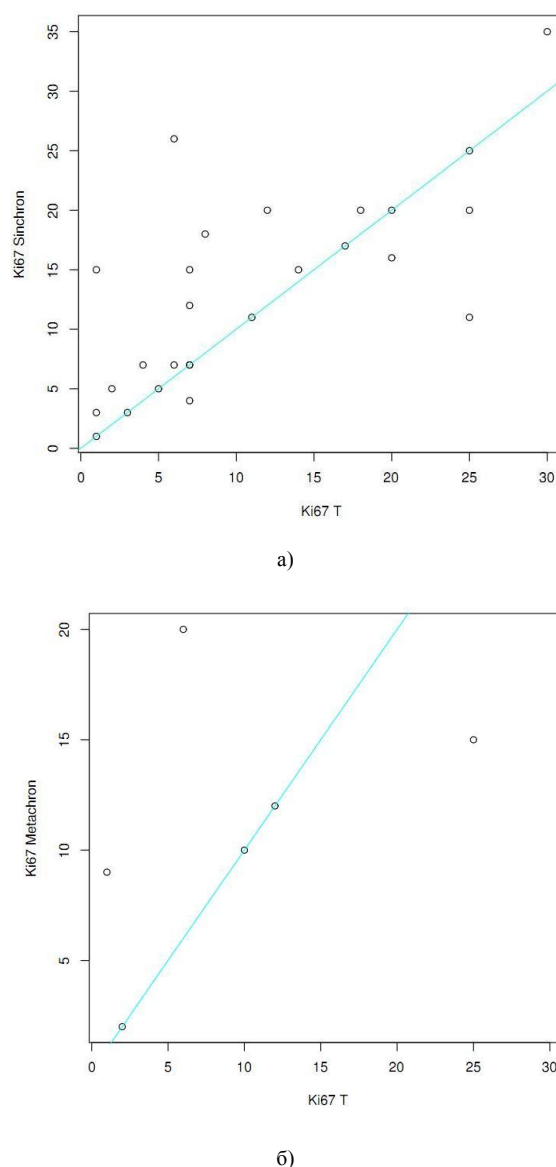
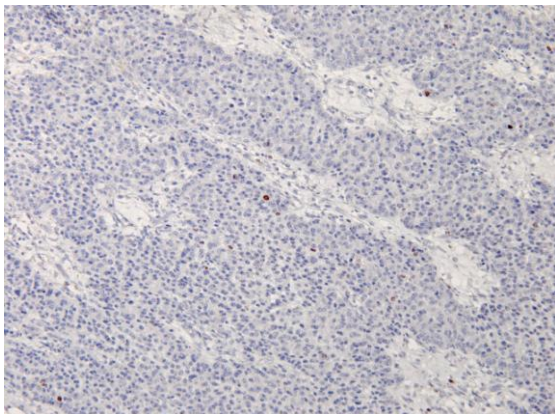
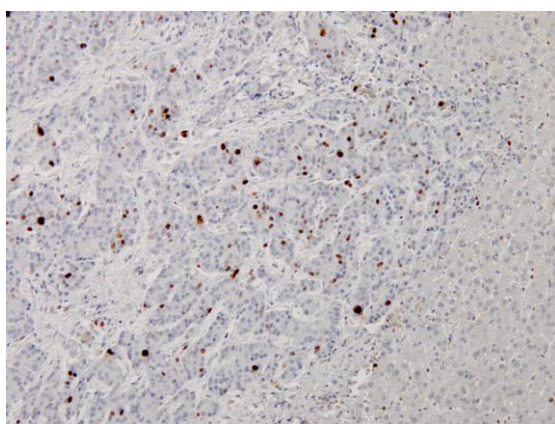


Рис. 1. Сравнительный анализ пролиферативной активности (индексов Ki-67) в первичной опухоли и соответствующих синхронных (а) и метастатических (б) метастазах НЭО ПЖ в печени



а)



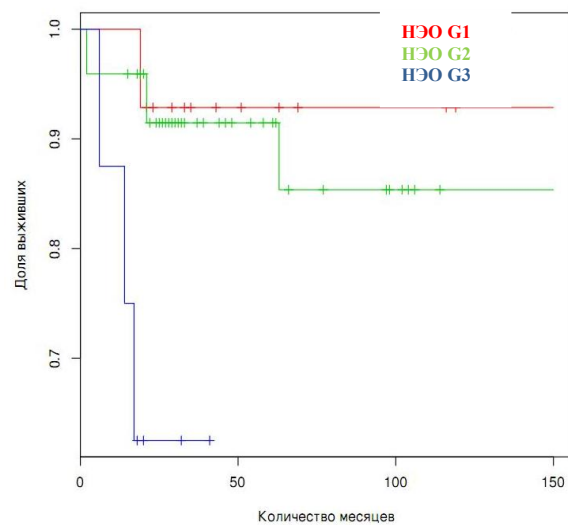
б)

Рис. 2. Рост пролиферативной активности клеток НЭО ПЖ в метастазе в печени: а) первичная опухоль. Индекс Ki-67 равен 1 %, что соответствует низкой степени злокачественности G1 ($\times 200$); б) метасинхронный метастаз данной опухоли в печени. Индекс Ki-67 равен 9 %, что соответствует промежуточной степени злокачественности G2 ($\times 200$)

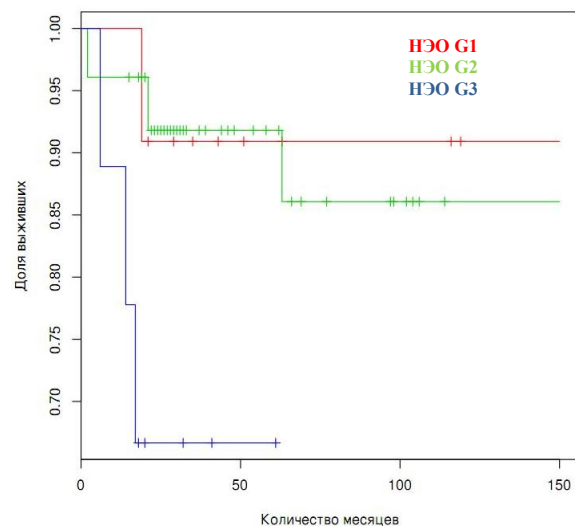
Оценка выживаемости больных НЭО ПЖ в зависимости от степени злокачественности как первичных, так и метастатических очагов демонстрировала статистически достоверные различия ($p = 0,01$ и $p = 0,03$, соответственно) (рис. 3а, 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническое течение как локализованных, так и метастатических форм НЭО ПЖ отличается значительным разнообразием. Определение пролиферативной активности клеток опухоли имеет большое значение для своевременного уточнения злокачественного потенциала новообразования и выбора оптимального лечения. Результаты многочисленных исследований демонстрируют различия в количестве пролиферирующих клеток в первичных и метастатических очагах новообразования [6, 8, 13, 16]. Наиболее важным моментом является тот факт, что рост пролиферативной активности в метастазах НЭО ПЖ может сопровождаться повышением степени злокачественности опухоли, что требует изменений в подходах к ведению и лечению больного [3, 9, 11, 14, 17].



а)



б)

Рис. 3. График общей выживаемости (ОВ) в зависимости от степени злокачественности НЭО ПЖ (метод Каплана–Майера): а) ОВ в зависимости от степени злокачественности первичных опухолей ($p = 0,01$); б) ОВ в зависимости от степени злокачественности отдаленных метастазов ($p = 0,03$)

Проведенный в настоящем исследовании анализ пролиферативной активности клеток отдаленных метастазов НЭО ПЖ в печени выявил повышение индекса Ki-67 в 52,0 % вторичных очагов опухолевого роста. При этом пролиферативный индекс в метастазах в печени возрастал в 1,7–15 раз по сравнению с первичной опухолью, что в 4 наблюдениях сопровождалось увеличением степени злокачественности НЭО ПЖ. Показаны статистически достоверные различия между средними значениями индекса Ki-67 в первичных НЭО ПЖ и их отдаленных метастазах в печени ($p = 0,000$), а также между выживаемостью больных, имеющих различную степень злокачественности как первичных, так и метастатических опухолей ($p = 0,01$ и $p = 0,03$, соответственно).

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что рост пролиферативной активности в метастазах НЭО ПЖ является достаточно частым событием и в отдельных случаях ведет к увеличению степени злокачественности новообразования. В этой связи показатель пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67 следует относить к параметрам, которые обязательно должны определяться в процессе современной морфологической диагностики при исследовании метастатических опухолей. Точная и своевременная оценка индекса Ki-67 в метастазах является основой для уточнения степени злокачественности НЭО ПЖ и служит базой для дальнейшей клинической оценки агрессивности течения заболевания и обоснованного назначения соответствующих режимов лекарственного лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amador Cano A., García F., Espinoza A. et al. Nonfunctional neuroendocrine tumor of the pancreas: Case report and review of the literature // Int. J. Surg. Case Rep. 2013. V. 4. № 2. P. 225-228.
2. Klöppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms // Endocr.-Relat. Cancer. 2011. V. 18 (Suppl. 1). P. S1-S16.
3. Klimstra D.S., Modlin I.R., Adsay N.V. et al. 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. V. 34. № 3. P. 300-313.
4. Adsay V. Ki-67 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. V. 36. № 12. P. 1743-1746.
5. Boninsegna L., Panzuto F., Partelli S. et al. Malignant pancreatic neuroendocrine tumour: lymph node ratio and Ki-67 are predictors of recurrence after curative resections // Eur. J. Cancer. 2012. V. 48. № 11. P. 1608-1615.
6. Couvelard A. Ki-67 and neuroendocrine tumors // Ann Pathol. 2011. V. 31 (5 Suppl). P. S55-S56.
7. Tang L.H., Gonen M., Hedvat C. et al. Objective quantification of the Ki-67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods // Am. J. Surg. Pathol. 2012. V. 36. № 12. P. 1761-1770.
8. Couvelard A., Deschamps L., Ravaud P. et al. Heterogeneity of tumor prognostic markers: a reproducibility study applied to liver metastases of pancreatic endocrine tumors // Mod. Pathol. 2009. V. 22. № 2. P. 273-281.
9. McCall C.M., Shi C., Cornish T.C. et al. Grading of Well-differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors is Improved by the Inclusion of Both Ki-67 Proliferative Index and Mitotic Rate // Am. J. Surg. Pathol. 2013. V. 37. № 11. P. 1671-1677.
10. Oh T.G., Chung M.J., Park J.Y. et al. Prognostic factors and characteristics of pancreatic neuroendocrine tumors: single center experience // Yonsei. Med. J. 2012. V. 53. № 5. P. 944-951.
11. Remes S.M., Tuominen V.J., Helin H. et al. Grading of neuroendocrine tumors with Ki-67 requires high-quality assessment practices // Am. J. Surg. Pathol. 2012. V. 36. № 9. P. 1359-1363.
12. Scarpa A., Mantovani W., Capelli P. et al. Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients // Mod. Pathol. 2010. V. 23. № 6. P. 824-833.
13. Strosberg J., Nasir A., Coppola D. et al. Correlation between grade and prognosis in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors // Hum. Pathol. 2009. V. 40. № 9. P. 1262-1268.
14. Palazzo M., Lombard-Bohas C., Cadiot G. et al. 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. V. 25. № 2. P. 232-238.
15. Panzuto F., Boninsegna L., Fazio N. et al. Metastatic and locally advanced pancreatic endocrine carcinomas: analysis of factors associated with disease progression // J. Clin. Oncol. 2011. V. 29. № 17. P. 2372-2377.
16. 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. V. 35. № 6. P. 853-860.
17. Jamali M., Chetty R. Predicting prognosis in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumors: an overview and the value of Ki-67 immunostaining // Endocr. Pathol. 2008. V. 19. № 4. P. 282-288.

Поступила в редакцию 22 ноября 2013 г.

Delektorskaya V.V., Kozlov N.A., Chemeris G.Y. EXPRESSION OF Ki-67 IN DISTANT METASTASES OF NEUROENDOCRINE NEOPLASM OF PANCREAS

A retrospective analysis of 72 morphological primary NaN RV and synchronous and metachronous 32 metastases of these tumors in the liver is conducted. The aim of this study was to determine the proliferation index Ki-67 in primary tumors and metastases in the liver to detect clinically significant changes in proliferative activity of cells during tumor progression. The results showed that the Ki-67 index, defined in primary cells NEO prostate increases in 52.0 % of secondary foci of tumor growth in 1.7–15 times, accompanied in some cases change in the degree of malignancy. Furthermore, in primary and metastatic tumors there is a statistically significant difference between the mean index of Ki-67 ($p = 0.000$), and survival rates of patients depending on the grade of primary and metastatic tumors ($p = 0.01$ and $p = 0.3$, respectively). Thus, accurate and timely assessment of the index of Ki-67 in metastatic NETs RV is the basis for verifying grade and a base for further clinical evaluation of the aggressiveness of the disease and the sound administration of appropriate drug treatment regimes.

Key words: proliferation index Ki-67 of tumor cells; neuroendocrine tumors of pancreas; primary tumors; metastatic tumors.