

КЛИНИКО-ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Трифанов В.С.¹, Кит О.И.¹, Колесников Е.Н.¹, Карнаухов Н.С.¹, Тимошкина Н.Н.¹, Непомнящая Е.М.¹, Гудцова Т.Н.¹, Мещерякова М.Ю.¹, Базаев А.Л.¹

¹ФГБОУ «Ростовский научный исследовательский онкологический институт» Минздрава России», Ростов-на-Дону, e-mail: trifanov1975@yandex.ru

Нейроэндокринноклеточные опухоли – это группа относительно редких эпителиальных новообразований из клеток с нейроэндокринным фенотипом, являющихся частью общей диффузной нейроэндокринной системы и способных продуцировать гормоны или другие биологически активные амины. На сегодняшний день заболеваемость НЭО составляет 5,25 случая на 1 млн населения в год, а в ближайшие 2-3 года эпидемиологи прогнозируют увеличение этого показателя до 8 случаев и более. Не менее 40% от всех нейроэндокринноклеточных опухолей желудочно-кишечного тракта составляют нейроэндокринноклеточные опухоли поджелудочной железы, которые выявляются с частотой 3-5 случаев на 1 миллион населения в год. Тактику лечения и прогноз в значительной степени определяет точная морфологическая и иммуногистохимическая верификация с определением потенциала их злокачественности. В данной статье представлены результаты установленных иммунофенотипических особенностей нейроэндокринноклеточных опухолей поджелудочной железы, описаны диагностические маркеры с определением их специфичности и чувствительности, обобщен анализ наиболее характерных клинических проявлений. Приведена оценка отдаленных результатов хирургического лечения и установлена их связь со значениями маркера пролиферативной активности Ki-67. Нами предложена возможность оптимизации лечения нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы аналогами соматостатина на основании исследования индивидуального профиля экспрессии соматостатиновых рецепторов, что может повысить безрецидивную выживаемость и улучшить качество жизни пациентов.

Ключевые слова: нейроэндокринноклеточные опухоли, иммуногистохимический анализ, маркер, соматостатиновые рецепторы, специфичность, чувствительность.

CLINICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF PANCREATIC NEUROENDOCRINE TUMORS

Trifanov V.S.¹, Kit O.I.¹, Kolesnikov E.N.¹, Karnauhov N.S.¹, Timoshkina N.N.¹, Nepomnyashaya E.M.¹, Gudckova T.N.¹, Mesheryakova M.Y.¹, Bazaev A.L.¹

¹FGBOU "Rostov Research institute of oncology" Ministry of Health of Russia, Rostov-On-Don, e-mail: trifanov1975@yandex.ru

Neuroendocrine tumors (NEO) are a group of relatively rare epithelial neoplasms originating from cells with a neuroendocrine phenotype that are part of a common diffuse neuroendocrine system and are capable of producing hormones or other biologically active amines.. At least 40% of all neuroendocrine cell tumors of the gastrointestinal tract are neuroendocrine cell pancreatic tumors, which are detected with a frequency of 3-5 cases per 1 million population per year. Tactics of treatment and the prognosis is largely determined by accurate morphological and immunohistochemical verification with the definition of their potential for malignancy. This article presents the results of established immunophenotypic features of neuroendocrine tumors of the pancreas, describes diagnostic markers with the definition of their specificity and sensitivity, summarizes the analysis of the most common characteristic clinical manifestations. An assessment of the long-term results of surgical treatment is given and their relationship with the values of the proliferative activity marker Ki-67 is established. We have proposed the possibility of optimizing the treatment of neuroendocrine tumors of the pancreas by somatostatin analogues on the basis of a study of the individual expression profile of somatostatin receptors, what can increase recurrence-free survival rates and improve the quality of life of patients.

Keywords: neuroendocrine tumors, immunohistochemical analysis, marker, somatostatin receptors, specificity, sensitivity.

Нейроэндокринноклеточные опухоли (НЭО) – это разнородная группа новообразований, происходящих из нейроэндокринных клеток, способных к продукции гормонов и других веществ, обладающих биологически активными свойствами [1]. Научный

интерес к проблеме нейроэндокринных новообразований возрастает с каждым годом. Эта тенденция во многом связана с увеличением частоты их обнаружения относительно опыта прошлых лет, что может быть обусловлено широким внедрением в практику современных методов диагностики, повышенной онкологической настороженностью, а также абсолютным стремительным ростом заболеваемости НЭО под влиянием изменяющихся факторов внешней среды в условиях урбанизации [2]. За последние 30 лет отмечается значительное увеличение числа новых зарегистрированных случаев заболеваемости НЭО всех локализаций [2; 3]. Так, на сегодняшний день заболеваемость НЭО составляет 5,25 случая НЭО на 1 миллион населения в год [4]. Хотя НЭО могут встречаться во всех органах, где есть нейроэндокринные клетки, большая часть из них приходится именно на желудочно-кишечный тракт (61%), и не менее 40% от этого количества составляют НЭО поджелудочной железы (ПЖ) [4; 5]. По данным литературы, последние выявляются с частотой 3-5 случаев на 1 млн населения в год [6]. Одна из главных проблем НЭО ПЖ в Российской Федерации сводится к отсутствию единого регистра этих опухолей, в связи с чем нет достоверных данных о заболеваемости ими в нашей стране [7].

Долгое время НЭО оставались предметом многочисленных дискуссий по поводу представлений об их истинной биологии. С 1907 года, после того как Oberndorfer ввел термин «карциноид», считалось, что НЭО имеют доброкачественную природу [8]. Однако благодаря развитию электронной микроскопии, иммуногистохимическим и молекулярно-биологическим методам исследования было установлено, что НЭО – это группа опухолей с неопределенным злокачественным потенциалом, способных в отдаленные сроки после операции рецидивировать и метастазировать [9]. Этот факт произвел настоящую революцию во взглядах ученых на проблему НЭО. Был сделан вывод, что, несмотря на сходные особенности в отношении морфологического строения, НЭО ЖКТ и ПЖ представляют собой гетерогенную группу, внутри которой существует множество различий как на клиническом уровне, так и на молекулярном. Данное обстоятельство определяет необходимость дифференцированного подхода к ведению пациентов с НЭО. Важное значение в диагностике НЭО ПЖ имеют морфологическое и иммуногистохимическое исследования, которые позволяют с высокой точностью установить потенциал злокачественности опухолей и на этом основании определить тактику лечения и сделать соответствующие прогнозы [9; 10].

Классификация НЭО ПЖ претерпела множество изменений, и в настоящее время рекомендовано использовать новую классификацию ВОЗ НЭО ПЖ от 2017 года, где основным фактором для определения злокачественности (Grade) также считается уровень индекса пролиферативной активности Ki-67 ($Ki-67 \leq 2$ – G1, $Ki-67 3-20\%$ – G2, $Ki-67 > 20\%$ – G3), но новая концепция предполагает выделение высокодифференцированных НЭО ПЖ

(G1, G2, G3), низкодифференцированных нейроэндокринных карцином (G3), в том числе их крупно- и мелкоклеточные варианты, смешанных карцином (MiNEN) [10]. Иммуногистохимический анализ, в свою очередь, позволяет подтвердить нейроэндокринную природу опухоли и уточнить ее гормональный статус.

Лечение НЭО ПЖ, как и их диагностика, требует мультидисциплинарного подхода. Это значит, что хирургическое лечение в иных случаях необходимо сочетать с химиотерапевтическими препаратами (особенно при низкодифференцированных карциномах) и препаратами из группы аналогов соматостатина. Применение последних является наиболее перспективным направлением в современной онкологии, но перед их назначением требуется иммуногистохимическое подтверждение экспрессии специфических рецепторов к соматостатину (SSTR2) на клетках опухоли [10]. В настоящее время нет достоверных данных о характере экспрессии данных рецепторов в различных органах и тканях, поэтому для изучения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования с большими и репрезентативными выборками. Все вышеперечисленное обуславливает высокую актуальность проблемы НЭО ПЖ.

Цель исследования. Проанализировать иммунофенотипические особенности НЭО ПЖ, выраженность экспрессии диагностически значимых маркеров (Ki-67, синаптофизин, CD-56, NSE, Хромогранин А, СК-7, СК-18, СК-20, AE1/AE3) и оценить отдаленные результаты хирургического лечения.

Материалы и методы исследования. Для нашего исследования мы использовали тканевые образцы операционных биопсий 20 НЭО ПЖ, выполненных в период с 2011 по 2018 год в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте (РНИОИ) г. Ростов-на-Дону. Возраст пациентов, включенных в исследование, на момент начала лечения варьировал от 23 до 72 лет. Из них 45% составили мужчины, 55% - женщины. В ходе работы иммуногистохимически определяли степень экспрессии следующих маркеров: Ki-67, синаптофизин, CD-56, NSE, Хромогранин А, СК-7, СК-18, СК-20, AE1/AE3. Экспрессию маркеров оценивали стандартно: для цитоплазматических маркеров использовался полуколичественный метод, а для маркера активности клеточной пролиферации Ki-67 применялся количественный метод, заключающийся в подсчете процента позитивноокрашенных клеток на 500-2000 неокрашенных в так называемых горячих точках - участках наибольшего скопления окрашенных опухолевых клеток.

Результаты исследования и их обсуждение. Закончив иммуногистохимический анализ тканевых образцов НЭО ПЖ, мы получили следующие результаты. Из 20 исследованных случаев в пяти образцах опухолей экспрессия Ki-67 составила 20-100%, в шести образцах - 3-20%, в девяти образцах - 1-2%. В соответствии с классификацией ВОЗ

НЭО ПЖ от 2017 года исследованные тканевые образцы были ранжированы по следующим подтипам: 25% составили низкодифференцированные нейроэндокринноклеточные карциномы (NEC, G3), 30% - высокодифференцированные НЭО (NET, G2), 45% - высокодифференцированные НЭО (NET, G1).

Полученные результаты ИГХ-исследования экспрессии девяти маркеров представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика экспрессии исследованных маркеров в образцах НЭО ПЖ

№	Наименование маркера	Частота выявления (%)	Частота резко выраженной реакции	Частота умеренно выраженной реакции	Частота слабо выраженной реакции
1.	СК 7	1 (5%)	0	0	1
2.	СК 18	16 (80%)	1	2	13
3.	СК 20	0	0	0	0
4.	Пан-цитокератин AE1/AE3	15 (75%)	5	1	9
5.	NSE	19 (95%)	16	3	0
6.	CD 56	5 (25%)	0	0	5
7.	Synaptophysin	10 (50%)	1	0	9
8.	Chromogranin A	11 (55%)	1	4	6
9.	SSTR 2-го типа	10 (50%)	9	1	0

В нашем исследовании NSE выявлялась в 19 из 20 случаев (таблица 1), при этом преобладали резко выраженная и умеренно выраженная реакции. По результатам нашего исследования, экспрессия CD56 в 4 случаях из 20 имела слабо выраженную реакцию, в 1 случае наблюдали очаговую слабо выраженную реакцию. В 75% случаев экспрессия этого маркера отсутствовала (таблица 1). Хромогранин А выявили (таблица 1) в 55% всех случаев, из них в 1 случае наблюдали резко выраженную реакцию, 4 образца имели умеренно выраженную реакцию, а 3 – слабо выраженную реакцию, и ещё в 3 случаях наблюдали очаговую слабо выраженную реакцию. Соответственно в 45% случаев реакция на хромогранин А была отрицательной. Отметим, что отсутствие экспрессии хромогранина А сочеталось с низкодифференцированными нейроэндокринноклеточными карциномами ПЖ (NEC, G3). На основании полученных данных мы сделали вывод, что, несмотря на достаточно высокую специфичность и чувствительность этого маркера для нейроэндокринных опухолей, его выявление не всегда обязательно в низкодифференцированных опухолях с большим злокачественным потенциалом. В нашем исследовании синаптофизин выявили в 50% случаев (таблица 1), из них в 1 случае отмечали

резко выраженную реакцию, в 1 случае – очагово слабо выраженную реакцию, в 8 наблюдали слабо выраженную реакцию. Экспрессия синаптофизина, в отличие от хромогранина А, присутствовала в низкодифференцированных нейроэндокринноклеточных карциномах (NEC, G3), что повышает диагностическую значимость данного маркера. Анализ экспрессии СК7, СК20 и СК18 дал неоднозначные результаты. В нашем исследовании только в 1 случае (таблица 1) была отмечена выраженная реакция на маркер СК7, в остальных 95% его экспрессия отсутствовала. Экспрессия СК20 не была зафиксирована ни в одном из 20 случаев НЭО ПЖ. Напротив, СК18 был выявлен в 80% случаев (таблица 1), при этом в 13 случаях преобладала слабо выраженная реакция. В отношении 1-го образца была зафиксирована резко выраженная реакция, для 2 образцов - умеренно выраженная реакция. Экспрессия же АЕ1/АЕ3 выявлялась в 75% всех случаев, в 5 случаях была отмечена резко выраженная реакция, в 1 - умеренно выраженная, в 9 - слабо выраженная реакция. Соответственно в 25% случаев АЕ1/АЕ3 не обнаруживалось. По результатам нашего исследования экспрессия SSTR2 на клетках НЭО ПЖ выявлялась только в 50% случаев, при этом в 9 случаях наблюдали резко выраженную реакцию, а в 1 – умеренно выраженную реакцию. Таким образом, полученные данные продемонстрировали высокую специфичность и чувствительность NSE и АЕ1/АЕ3, экспрессию которых обнаружили соответственно в 95% и 75% всех случаев НЭО ПЖ. Напротив, экспрессия CD56 не была отмечена ни в одном из исследованных образцов НЭО ПЖ, что ставит под сомнение использование этого маркера для дифференциальной диагностики НЭО ПЖ в рутинной практике. Анализ экспрессии цитокератинов СК7, СК20, СК18 выявил неоднозначные результаты. Несмотря на то что антитела к данным маркерам широко используются для проведения дифференциальной диагностики между опухолями эпителиального и неэпителиального происхождения, экспрессия СК7 и СК20 практически отсутствовала в 20 образцах НЭО ПЖ. Напротив, СК18 продемонстрировал достаточно высокую чувствительность для НЭО ПЖ. Поскольку показатель экспрессии рецептора соматостатина является прогностическим фактором, определяющим чувствительность опухоли к синтетическим аналогам соматостатина, то иммуногистохимическая идентификация SSTR2 служит ключевым моментом в предопределении тактики лечения НЭО ПЖ. На основании наших данных можно сделать вывод, что периоперационная лекарственная терапия данными препаратами может быть эффективна только у 50% пациентов. В остальных случаях приоритет отдается самостоятельному хирургическому лечению и другим возможным схемам терапии.

Результаты оценки клинических проявлений. Несмотря на относительно сходные общие иммуногистохимические характеристики, клинические проявления у всех 20 пациентов различались, что связано с различной гормональной активностью и

функциональным состоянием опухолей. Была проведена работа с историями болезни, на основании чего ретроспективно было установлено, что средняя длительность заболевания от первых жалоб до постановки диагноза составила $3,5 \pm 0,8$ года. Интересен тот факт, что средняя продолжительность заболевания для гормонально-неактивных НЭО ПЖ составила $4,2 \pm 0,5$ года, а для гормонально-активных НЭО ПЖ этот период был меньше, составив $2,8 \pm 0,3$ года. Полученные результаты оценки основных клинических форм НЭО ПЖ представлены в таблице 2.

Таблица 2

Распределение по клиническим формам НЭО ПЖ

НЭО ПЖ	Количество, %	Мужчины, %	Женщины, %	Возраст	Лабораторный маркер
Инсулинома	30% (6/20)	33,4% (2/6)	66,7% (4/6)	От 36 до 57 лет	Глюкоза ниже 2,2 ммоль/л при нормальном или повышенном значении инсулина
Соматостанинома	25% (5/20)	40% (2/5)	60% (3/5)	От 23 до 67 лет	Соматостатин более 1000 пг/мл
Глюкагонома	15% (3/20)	66,7% (2/3)	33,4% (1/3)	От 44 до 52 лет	Глюкагон до 750-2500 пг/мл
Випома	5% (1/20)	100% (1/1)	0% (0/1)	34 года	ВИП-гормон более 84 пмоль/л
Нефункционалирующие НЭО ПЖ	25% (5/20)	20% (1/5)	80% (4/5)	От 43 до 50 лет	-

У всех 5 пациентов с нефункционирующими НЭО ПЖ на момент постановки диагноза уже имелось метастатическое поражение печени (100%). Последний факт составляет особо важную проблему диагностики нефункционирующих НЭО, так как отсутствие клиники в 95% случаев, по данным различных исследований, приводит к несвоевременной постановке диагноза. Замечательно, что нефункционирующие НЭО ПЖ, не вызывая лабораторного повышения тех или иных гормонов, иммуногистохимически реагируют со всеми маркерами, в том числе с хромогранином А и синаптофизином. Это еще раз подчеркивает важную роль иммуногистохимического анализа в диагностике НЭО ПЖ.

Отдаленные результаты хирургического лечения. На момент анализа данных ИГХ-исследования (февраль 2019 года) девять пациентов с высокодифференцированными НЭО

ПЖ (NET, G1) были живы. Смертность пациентов с высокодифференцированной НЭО ПЖ (NET, G2) составила 50%, а пациентов с низкодифференцированной НЭО ПЖ (NET, G3) - 80%. В итоге после хирургического лечения общая выживаемость составила 65% (период от 3 до 84 месяцев). Причинами смерти были собственно прогрессирование основного заболевания - метастазы в печень (85%), а также гипогликемическая кома (10%) и сердечная недостаточность (5%).

Заключение. Таким образом, была установлена связь отдаленных результатов хирургического лечения НЭО ПЖ с их злокачественным потенциалом. Нами были проанализированы основные иммунофенотипические особенности этой группы опухолей, выяснены ведущие клинические проявления разных форм НЭО ПЖ. В дальнейшем мы планируем расширить выборку исследования, для того чтобы разработать достоверные иммуногистохимические критерии НЭО ПЖ, которые позволят подбирать правильную тактику ведения пациентов с этим диагнозом. По нашему мнению, изучение особенностей экспрессии соматостатиновых рецепторов 2-го типа в перспективе позволит оптимизировать лечение препаратами из группы аналогов соматостатина и тем самым расширить имеющиеся терапевтические возможности, повысить безрецидивную выживаемость и улучшить качество жизни пациентов.

Список литературы

1. Кит О.И., Карнаухов Н.С., Новикова Е.А., Трифанов В.С. Скрининг нейроэндокринного компонента в раке желудка // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25092> (дата обращения: 30.04.2019).
2. Кит О.И. Нейроэндокринные, клинические и морфологические аспекты рака желудка. Новочеркасск: Издательство «Лик», 2014. 187 с.
3. Clift A.K., Frilling A. Management of patients with hepatic metastases from neuroendocrine tumors. Ann Saudi Med. 2014. vol. 34. no. 4. P. 279-290.
4. Eadens M.J., Grothey A. Curable metastatic colorectal cancer. Curr Oncol rep. 2011. vol. 13. no. 3. P. 168-176.
5. Frankel T.L., D'Angelica M.I. Hepatic resection for colorectal metastases. J. Surg. Oncol. 2014. vol. 109. no. 1. P. 2-7.
6. Galizia M.S., Tore H.G., Chalian H. Evaluation of hepatocellular carcinoma size using two-dimensional and volumetric analysis: effect on liver transplantation eligibility. Acad. Radiol. 2011. vol. 18. no. 12. P. 1555-1560.

7. Monsky W.L., Garza A.S., Kim I. Treatment planning and volumetric response assessment for Yttrium-90 radioembolization: semiautomated determination of liver volume and volume of tumor necrosis in patients with hepatic malignancy. *Cardiovasc. Intervent Radiol.* 2011. vol. 34. no. 2. P. 306-318 .
8. O'Dorisio T.M., Anthony L.B. A 25-year experience of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and somatostatin (congeners) analogs: from symptom control to antineoplastic therapy. *Front Horm Res.* 2015. vol. 44. no. 2. P. 177-192.
9. Rahbari N., Mehrabi A., Mollberg N. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. *Ann. Surg.* 2011. vol. 253. no. 4. P. 453-469.
10. Kit O.I., Trifanov V.S., Novikova I.A., Todorov S.S. Clinical, pathological, and immunohistochemical features of pancreatic neuroendocrine tumors. *Journal of clinical oncology.* 2017. vol. 34. no. 3. P. 151-159.