© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.33/.34-006.6-091.8

СТЕПЕНЬ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ И ПРОГНОЗ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

В.В. Делекторская, доктор медицинских наук,
Н.А. Козлов, **Г.Ю. Чемерис**, кандидат биологических наук
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
E-mail: delektorskaya@yandex.ru

Представлен ретроспективный клинико-морфологический анализ 60 случаев локализованных и метастатических нейроэндокринных опухолей (НЭО) различных отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) для изучения корреляции пролиферативной активности опухолевых клеток с клинико-морфологическими параметрами и показателями выживаемости. Экспрессия Ki67 была оценена в первичных опухолях и их метастазах в лимфатических узлах и печени. Изучены морфологические особенности различных типов опухолей, включая НЭО G1 и G2, а также редкую группу НЭО G3. В результате проведенного исследования показано, что пролиферативная активность во вторичных очагах опухолевого роста может возрастать в процессе опухолевой прогрессии в 1,5–4,5 раза по сравнению с первичной опухолью. Достоверная взаимосвязь выявлена между показателями пролиферативной активности (экспрессией Ki67) и частотой развития отдаленных метастазов, размерами первичной опухоли и выживаемостью пациентов с НЭО ЖКТ. Таким образом, индекс пролиферации Ki67 является ключевым параметром морфологической диагностики НЭО ЖКТ, оценка которого в каждом месте развития опухолевого процесса имеет принципиальное значение для точного определения степени злокачественности, прогноза и особенностей лечения метастатических опухолей.

Ключевые слова: *нейроэндокринная опухоль, желудочно-кишечный тракт, пролиферативная активность, степень злокачественности, прогноз*

GRADE OF MALIGNANCY AND PROGNOSIS OF WELL-DIFFERENTIATED NEUROENDOCRINE TUMORS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

V.V. Delektorskaya, N.A. Kozlov, G.Yu. Chemeris
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

To study the correlation of proliferative activity of tumor cells with clinical and morphological parameters and indices of survival rates a retrospective clinical and morphological analysis of 60 cases of localized and metastatic neuroendocrine tumors (NETs) of the various parts of the gastrointestinal tract is presented. Ki67 expression was evaluated in primary tumors and their metastases in the lymph nodes and liver. Morphological features of different types of tumors, including NET G1 and NET G2, as well as the rare group of NET G3. As a result of the study it was shown that the proliferative activity in the secondary foci of tumor growth may increase during tumor progression in 1,5–4,5 times in comparison with the primary tumor. Significant interrelationship was found between indices of proliferative activity (expression of Ki67) and the incidence of the development of distant metastases, the size of the primary tumor and survival rate of patients with gastrointestinal NETs. Thus, proliferation index (expression of Ki67) is a key parameter of the morphological diagnostics of gastrointestinal NETs. The estimation of Ki67 proliferation index in the each site of the locations of the tumor process is critical for accurate determination of the grade of malignancy, prognosis, and features of treatment of metastatic tumors.

Key words: *neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract, proliferative activity, the grade of malignity, the prognosis*

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) представляют собой неоднородную группу эпителиальных новообразований, которые значительно различаются по биологическим характеристикам, клиническому течению и прогнозу [5, 8, 9]. Последняя классификация Всемирной организации здравоохранения (WHO, 2010) разделяет все НЭО ЖКТ с учетом степени дифференцировки на 2 основные группы: высокодифференцированные и низкодифференцированные нейроэндокринные новообразования [9]. Ключевым элементом морфологической диагностики является определение степени злокачественности с учетом индекса пролиферации (ИП) Ki67, позволяющее выделить 3 прогностические категории: опухоли низкой (G1), промежуточной (G2) и высокой (G3) степени злокачественности [1, 3, 5, 6]. Все высокодифференцированные неоплазии, независимо от того, имеют они относительно благоприятное течение или дают метастазы, называют НЭО и имеют

градацию G1 (Ki67 ≤3%) или G2 (Ki67 3–20%). Низкодифференцированные новообразования составляют отдельную группу высокоагрессивных опухолей, для обозначения которых используют термин «нейроэндокринный рак» и градацию G3 (Ki67 >20%). Эта группа включает новообразования мелко- и крупноклеточного типа.

Определение степени злокачественности и дальнейшее стадирование в соответствии с критериями TNM-системы позволяют стратифицировать НЭО ЖКТ в отношении их прогноза [8, 9]. Изучение патогенеза и молекулярно-генетических нарушений в нейроэндокринных неоплазиях свидетельствует о значительных различиях высоко- и низкодифференцированных вариантов данных опухолей и малой вероятности перехода одной формы в другую [8]. Однако, известно, что в высокодифференцированных НЭО часто отмечается гетерогенное распределение участков наивысшей пролиферативной активности [1, 2, 11]. При этом индекс Ki67 может со временем меняться, что отражается на степени злокачественности и прогнозе заболевания [7, 8, 12]. В этой связи большой интерес представляет детальная клинико-морфологическая характеристика группы НЭО G2, в рамках которой наблюдаются большие различия значений индекса Ki67 и вариантов клинического течения заболевания.

Целью настоящего исследования были оценка особенностей экспрессии Ki67 в клетках первичных и метастатических НЭО различных отделов ЖКТ и выявление взаимосвязи ИП с ключевыми клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены клинические данные и операционный материал, полученный у 60 пациентов с НЭО различных отделов ЖКТ, находившихся на хирургическом лечении в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 1994–2011 гг. Средний возраст больных на момент диагностики составил 53,7 года (от 19 до 78 лет), соотношение мужчин и женщин было – 0,67 (24 мужчины и 36 женщин).

Первичные опухоли ЖКТ были представлены НЭО желудка – в 18 случаях, подвздошной кишки – в 20, толстой кишки – в 13, двенадцатиперстной кишки – в 7, аппендикса – в 2 случаях. Размер первичных опухолей составлял 0,3 – 16,0 см (в среднем – 2,5 см). В общей группе у 42 (70,0%) больных на момент постановки диагноза имелись регионарные и(или) отдаленные метастазы со следующим распределением по стадиям: I – 4 (6,7%) пациента, II – 7 (11,7%), III – 22 (36,7%), IV – 27 (45,0%) (AJCC/UICC, 2009). Длительность послеоперационного наблюдения варьировала в пределах 6–255 мес. За это время у 2 (8,6%) пациентов выявлен локальный рецидив, у 14 (23,3%) обнаружены метахронные отдаленные метастазы. 14 (23,3%) больных умерли от прогрессирования заболевания; медиана общей (ОВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости составила соответственно 35 и 27 мес.

Ретроспективный анализ операционного материала включал только первичные НЭО ЖКТ (16 случаев), а также первичные и метастатические (синхронные и метахронные) очаги (44 случая). Диагноз в каждом случае был подтвержден на основе пересмотра гистологических препаратов и иммуногистохимического (ИГХ) исследования.

Среди основных морфологических параметров были исследованы: размеры первичного и метастатического очагов, степень гистологической дифференцировки, митотическая активность, локальная инвазия и прорастание окружающих органов, наличие внутрисосудистой и периневральной инвазии, очагов некроза, регионарных и отдаленных метастазов.

Во всех наблюдениях нейроэндокринная природа опухоли подтверждена с помощью ИГХ-окраски с антителами к хромогранину А и синаптофизину. Градация опухолей проведена на основании оценки гистологической структуры, митотической активности и индекса Ki67 в соответствии с критериями классификации WHO 2010 [9]. Случаи низкодифференцированного нейроэндокринного рака и смешанного адено-нейроэндокринного рака были исключены из исследования.

ИГХ-окрашивание выполнено на серийных парафиновых срезах ткани первичных и метастатических опухолей с использованием антител к Ki67 (MIB-1, Dako), хромогранину А (клон LK2H10, DBS), синаптофизину (клон Snp88, Biogenex) и в отдельных случаях – к CD56 (клон BC56C04, Biocare), панцитокератину (AE1/AE3, Dako), цитокератину 18 (клон DC10, Dako), D2-40 (клон D2-40, Dako), CD31 (клон BC2, BioCare), p53 (DO7, Biogenex), а также системы детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP (BioGenex). Депарафинизированные срезы обрабатывали в цитратном буфере pH 6,0 в водяной бане при 95°C в течение 40 мин. Результаты экспрессии маркеров оценивали 2 морфолога. Индекс Ki67 выражали как процент положительно окрашенных ядер опухолевых клеток в зонах наибольшей пролиферативной активности при учете 2000 клеток.

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 Каплана–Майера. Достоверность различий в выживаемости оценивали с помощью log-rank-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее частой локализацией первичных опухолей в исследованной группе, включающей 60 пациентов с НЭО различных отделов ЖКТ, были подвздошная кишка (20 случаев – 33,3%) и желудок (18 случаев – 30,0%). Регионарные и отдаленные метастазы НЭО преобладали в случае НЭО подвздошной кишки (соответственно 70,0 и 90,0%) и толстой кишки (69,2 и 53,8%). Клинико-морфологическая характеристика больных с НЭО ЖКТ с учетом анатомической локализации опухоли представлена в табл. 1.

Во всех наблюдениях новообразования характеризовались типичным для высокодифференцированных НЭО гистологическим строением и были представлены гнездными, трабекулярными и ацинарно-тубулярными структурами, сформированными мономорфными мелкими клетками со слабой степенью атипии (рис. 1, а). Сосудистая инвазия обнаружена в 36 (60,0%) случаях, периневральная инвазия – в 6 (10,0%), очаговые некрозы – 10 (16,7%). Строение метастатических очагов чаще полностью соответствовало первичной опухоли.

При ИГХ-исследовании первичные и метастатические НЭО диффузно экспрессировали хромогранин А, синаптофизин, панцитокератин AE1/AE3 и цитокератин 18 (рис. 1, б–в).

Первичные НЭО ЖКТ в 14 (23,3%) случаях были отнесены к НЭО G1 (Ki67 – 1–2%), в 41 (68,3%) – к НЭО G2 (Ki67 – 3–20%). В оставшихся 5 (8,3%) наблюдениях клетки НЭО демонстрировали пролиферативную активность (Ki67=25–35%), которая превышала пороговое для НЭО G2 значение. Эти опухоли были выделены в отдельную группу, обозначенную как «НЭО G3». Новообразования имели типичное органоидное или гнездное строение в сочетании с зонами солидного роста и демонстрировали диффузную экспрессию хромогранина А и синаптофизина. Ядерная экспрессия белка p53, типичная для низкодифференцированного рака, в клетках НЭО G3 отсутствовала.

Сравнительный анализ ИП клеток первичных опухолей и их метастазов в лимфатических узлах и печени (синхронных или метахронных) проводили в 40 наблюдениях. Среднее значение Ki67 в первичных НЭО ЖКТ, регионарных и отдаленных метастазах было равно соответственно 5,8, 9,2 и 12,3%. При сопоставлении с первичными НЭО обнаружено увеличение пролиферативной активности клеток в метастазах в 1,5–4,5 раза в 9 (22,5%) случаях. Наиболее часто ИП менялся в НЭО G2 подвздошной кишки, имеющих значения Ki67 в первичных опухолях, равные 4–6%. Так, в одном из случаев индекс Ki67 в первичной опухоли составлял 6%, в метастазе в лимфатическом узле – 25%, в печени – 27% (рис. 1, г–е). В результате повышения ИП в метастазах в 6 (15,0%) наблюдениях выявлено изменение степени злокачественности НЭО: в 3 случаях градация опухоли в первичном очаге соответствовала G1, а в метастазах в печени – G2, и в 3 случаях в первичном очаге – G2, а в метастазах в лимфатических узлах и печени – G3. Только в одном наблюдении НЭО G2 двенадцатиперстной кишки отмечалось снижение ИП в метастазах.

С учетом максимального показателя пролиферативной активности клеток первичных и метастатических очагов опухолевого роста нейроэндокринные неоплазии ЖКТ были классифицированы как НЭО G1 (Ki67 – 1–2%) в 11 (18,3%) наблюдениях, НЭО G2 (Ki67 – 3–20%) – в 41 (68,3%) и НЭО G3 (Ki67 – 21–35%)– 8 случаях (13,3%).

При сравнении пролиферативной активности в группах локализованных и метастатических НЭО значительно более высокая экспрессия Ki67 была выявлена у больных, опухоли у которых сопровождались развитием метастазов (p=0,012). Средний ИП составил 7,2% в группе больных без метастазов и 16,9% – метастазами. Обнаружена статистически достоверная положительна связь между высоким уровнем Ki67 и размером первичной опухоли (критерием pT по системе TNM; p=0,010). Мы не нашли различий в экспрессии Ki67 в зависимости от лока-

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУЧАЕВ НЭО ЖКТ С УЧЕТОМ АНАТОМИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Анатомическая локализация	Число больных			Возраст, интервал (средний), годы	Средний размер опухоли, см	Наличие метастазов, %	
	всего	мужчины	женщины			регионарных	отдаленных
	n (%)						
Желудок	18 (30,0)	10 (55,6)	8 (44,4)	19–71 (53,0)	4,9	7 (38,9)	0
Двенадцатиперстная кишка	7 (11,7)	3 (42,9)	4 (57,1)	37–61 (51,0)	4,7	3 (42,9)	2 (28,5)
Подвздошная кишка	20 (33,3)	4 (20,0)	16 (80,0)	24–73 (56,1)	2,9	14 (70,0)	18 (90,0)
Аппендикс	2 (3,3)	1 (50,0)	1 (50,0)	50–78 (64,0)	2,7	1 (50,0)	1 (50,0)
Толстая кишка	13 (21,7)	6 (46,2)	7 (53,8)	36–67 (50,9)	3,6	9 (69,2)	7 (53,8)
Всего	60 (100)	24 (40,0)	36 (60,0)	19–78 (52,5)	3,8	34 (100)	28 (100)

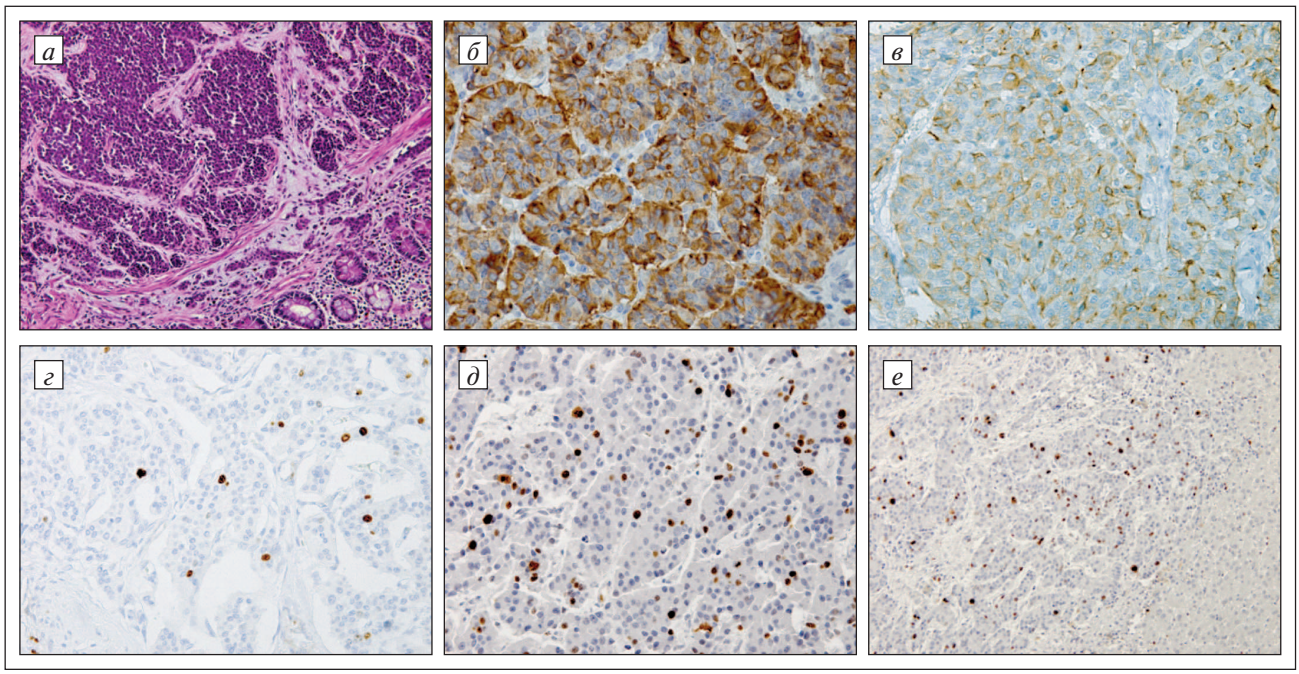

Рис. 1. *НЭО тонкой кишки: а – гнездное строение первичной опухоли (×200), окраска гематоксилином и эозином; б – ИГХ-экспрессия хромогранина А в клетках первичной опухоли (×400); в – ИГХ-экспрессия синаптофизина в клетках метастаза в печени (×400); г – индекс Ki67=6% в клетках первичной опухоли (×250); д – индекс Ki67=25% в клетках метастаза в лимфатическом узле (×400); е – индекс Ki67=27% в клетках метастаза в печени (×250), ядра клеток докрашены гематоксилином Майера*

лизации, наличия нейро-, сосудистой или местной инвазии, а также регионарных метастазов. Частота развития как регионарных, так и отдаленных метастазов увеличивалась в опухолях более высокой степенью злокачественности (табл. 2). Отмечалась достоверная связь частоты развития отдаленных метастазов НЭО ЖКТ со степенью злокачественности опухоли (p=0,01) и средними значениями Ki67 (p=0,024).

Общая 5-летняя выживаемость больных с НЭО низкой и промежуточной степени злокачественности составили соответственно 87 и 38%. За период наблюдения у 2 (18,1%) больных с НЭО G1 развились отдаленные метастазы (медиана ОВ и БРВ соответственно 47 и 30 мес). У 21 (51,2%) больного с НЭО G2 отмечено прогрессирование заболевания (медиана ОВ и БРВ – 38 и 27 мес). В группе НЭО G3 отдаленные метастазы и местный рецидив развились у 5 (62,5%) больных (медиана ОВ и БРВ – 31 и 27 мес).

Для анализа прогностической значимости ИП в пределах группы G2 опухоли были разделены на 4 подгруппы с учетом значения Ki67: 1-я – 3–5%; 2-я – 6–10%; 3-я – 11–15%; 4-я – 15–20%. Повышенная экспрессия Ki67 (>15%) в ядрах опухолевых клеток сочеталась с низким показателем 3-летней ОВ и БРВ (соответственно 33 и 16%) и было статистически значимо связано с худшим прогнозом, чем в других подгруппах (p=0,005; (рис. 2, а–б). Достоверные различия между группами G2 и G3 были выявлены только для ОВ и БРВ больных с НЭО желудка (p=0,001; рис. 2, в–г).

Таблица 2

НАЛИЧИЕ РЕГИОНАРНЫХ И ОТДАЛЕННЫХ МЕТАСТАЗОВ НЭО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ОПУХОЛИ

Тип опухоли	Число больных (n=60)	Больные с метастазами	
		регионарными (n=34)	отдаленными (n=30)
G1	11 (18,3)	4 (36,4)	3 (27,3)
G2	41 (68,3)	22 (53,7)	21 (51,2)
G3	8 (13,3)	8 (100)	6 (75,0)

Примечание. В скобках – %.

Изучение выживаемости в метастатической группе НЭО в зависимости от ИП продемонстрировало обратную взаимосвязь индекса Ki67 с показателем ОВ в группе с метастазами (p=0,002). Средние значения Ki-67 в метастазах были достоверно выше, чем в соответствующих первичных метастатических НЭО ЖКТ (p=0,0; рис. 3, а–б).

Определение злокачественного потенциала НЭО ЖКТ являет-

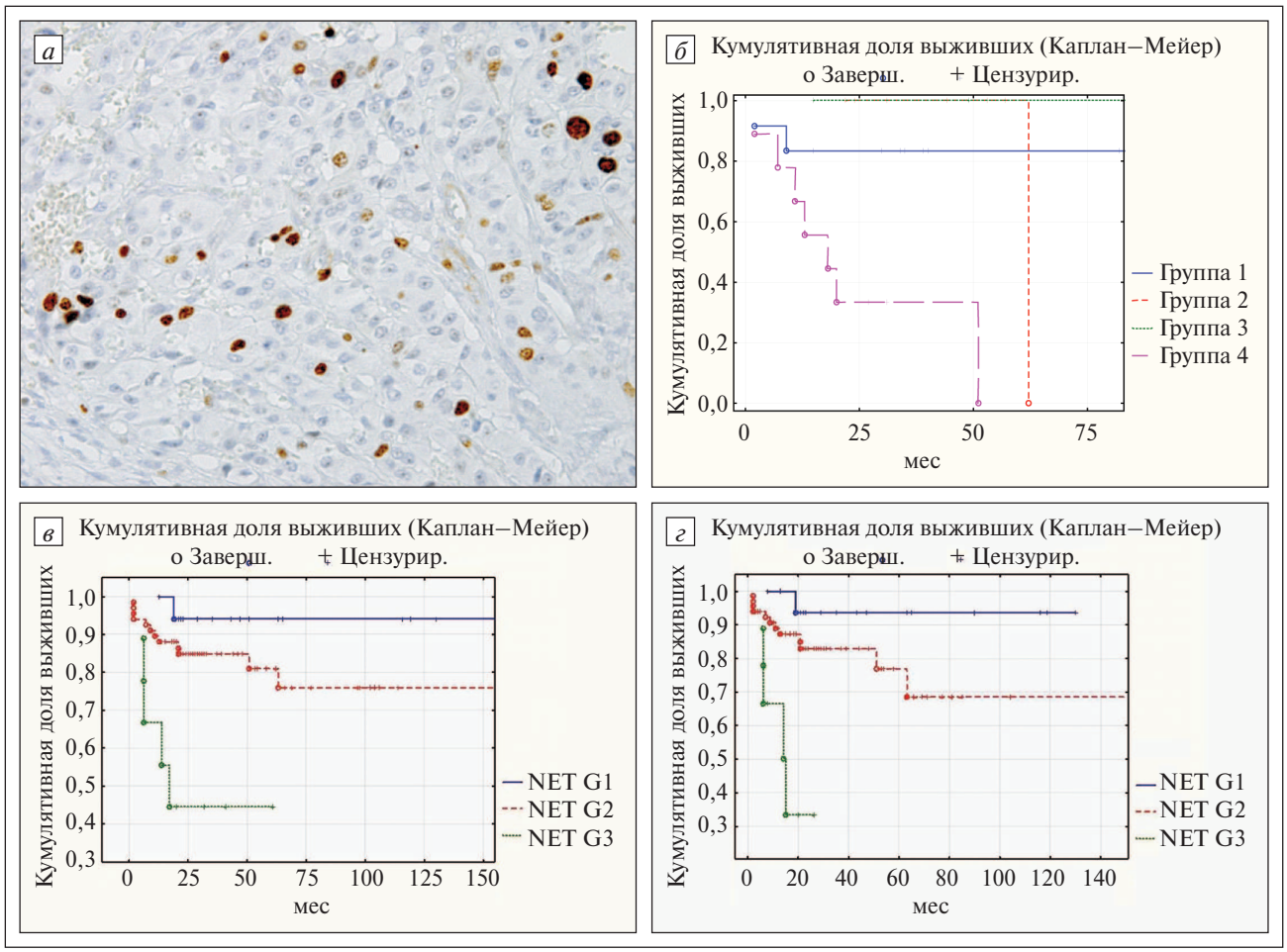

Рис. 2. *Выживаемость больных в зависимости от ИП НЭО ЖКТ: а – экспрессия Ki67 в НЭО толстой кишки равна 15%; б – ОВ в зависимости от ИП (4-я группа – Ki67 >15%); в–г – соответственно ОВ и БРВ при НЭО желудка в зависимости от степени злокачественности опухоли*

ся сложной диагностической проблемой и основой для оценки прогноза заболевания и получения оптимальных результатов при лечении данной патологии. Принимая во внимание, что более 60% больных. НЭО ЖКТ имеют метастазы на момент постановки диагноза, большое значение имеет уточнение степени злокачественности метастатических форм опухолей и изучение факторов, влияющих на их клиническое течение [8].

В результате проведенного исследования установлено, что пролиферативная активность во вторичных очагах опухолевого роста может возрастать в процессе опухолевой прогрессии в 1,5–4,5 раза по сравнению с первичной опухолью. Полученные данные подтверждают возможность перехода метастазов НЭО G1 в НЭО G2, а также трансформации со временем метастазов НЭО G2 в НЭО G3 [13, 14]. Аналогичные результаты получены в ряде морфологических исследований при изучении серии первичных НЭО G1-G2 поджелудочной железы и в единичных работах, посвященных исследованию высокодифференцированных НЭО тубулярного ЖКТ [4, 10, 11, 13, 14].

Значительно более высокая экспрессия Ki67 выявлена у больных, опухоли которых сопровождались развитием отдаленных метастазов (p=0,012) и имели высокий критерий pT по системе TNM (p=0,010). Средний индекс Ki67 составил 7,2% в группе больных без метастазов и 16,9% – в группе с метастазами. НЭО ЖКТ промежуточной степени злокачественности значительно различались по агрессивности течения и метастатическому потенциалу. Наиболее низкие показатели ОВ и БРВ наблюдались при Ki67 >15% и были статистически значимо связаны с худшим прогнозом заболевания (p=0,005). Кроме того, индекс Ki67 в 13,3% случаев НЭО ЖКТ превышал 20-процентный пороговый уровень, составляя 25–35%. Данный тип опухолей был отнесен к градации G3 в соответствии с фракцией пролиферации, но не гистологической структурой и степенью дифференцировки, и по прогнозу достоверно отличался от НЭО G2 при опухолях, локализованных в желудке (p=0,001). На основе анализа материала метастатических опухолей показано также, что индекс Ki-67 находится в обратной взаимосвязи с ОВ в группе с метастазами (p=0,002).

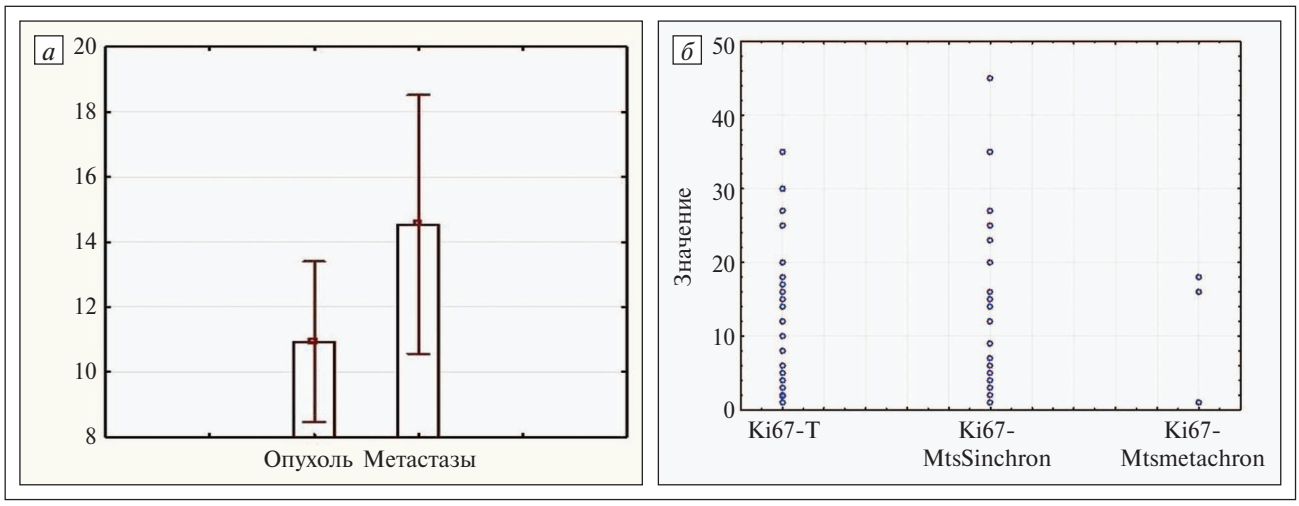

Рис. 3. *Сравнение ИП в первичных НЭО ЖКТ и в метастазах: а – средние значения Ki67 в первичных метастатических НЭО и соответствующих метастазах (тест Вилкоксона, p=0,000); б – распределение индекса Ki67 в метастатических НЭО, а также их синхронных и метахронных метастазах*

Таким образом, индекс пролиферации Ki67 является ключевым параметром морфологической диагностики НЭО ЖКТ, оценка которого в каждом из участков развития опухолевого процесса имеет принципиальное значение для точного определения степени злокачественности, прогноза и особенностей лечения метастатических опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amarapurkar A., Davies A., Ramage J. et al. Proliferation of antigen MIB-1 in metastatic carcinoid tumours removed at liver transplantation: relevance to prognosis // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2003; 15: 139–43.
2. 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; 22 (2): 273–81.
3. Cunningham J., Grimelius L., Sundin A. et al. Malignant ileocecal serotonin-producing carcinoid tumors: the presence of a solid growth pattern and/or Ki67 index above 1% identifies patients with a poorer prognosis // Acta Oncol. – 2007; 46: 747–56.
4. Dhall D., Mertens R., Bresee C. et al. Ki-67 proliferative index predicts progression-free survival of patients with well-differentiated ileal neuroendocrine tumors // Hum Pathol. – 2012; 43 (4): 489–95.
5. Hochwald S., Zee S., Conlon K. et al. Prognostic factors in pancreatic endocrine neoplasms: An analysis of 136 cases with a proposal for low grade and intermediate-grade groups // J. Clin. Oncol. – 2002; 20: 2633–42.
6. Hotta K., Shimoda T., Nakanishi Y. et al. Usefulness of Ki-67 for predicting the metastatic potential of rectal carcinoids // Pathol. Int. – 2006; 56: 591–96.
7. Jamali M., Chetty R. Predicting Prognosis in Gastroentero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors: An Overview and the Value of Ki-67 Immunostaining // Endocr Pathol. – 2008; 19: 282–88.
8. Klimstra D., Modlin I., Adsay N. 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; 34: 300–13.
9. Rindi G., Arnold R., Bosman F.T. et al. Nomenclature and classification of NENs of digestive system // in Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. (eds.): WHO Classification of tumors of the digestive system. IARC: Lyon. – 2010; 13–14.
10. Kasajima A., Pavel M., Darb-Esfahani S. et al. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours // Endocr. Relat. Cancer – 2011; 18 (1): 181–92.
11. Lindholm E., Lyons J. 3rd, Anthony C.T. et al. Do primary neuroendocrine tumors and metastasis have the same characteristics? // J. Surg. Res. – 2012; 174 (2): 200–6.
12. Strosberg J., Nasir A., Coppola D. et al. Correlation between grade and prognosis in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors // Hum. Pathol. – 2009; 40: 1262–8.
13. Tang L., Shia J., Vakiani E. et al. High grade transformation of differentiated neuroendocrine neoplasms of the enteropancreatic system – a unique entity distinct from de novo high grade neuroendocrine carcinoma in pathogenesis and clinical behavior // Mod. Pathol. – 2008; 21 (Suppl): 137A.
14. Tang L., Song L., Shia J. et al. Grade progression of well differentiated neuroendocrine tumors of the enteropancreatic system is distinct from poorly differentiated high grade neuroendocrine carcinomas // Mod. Pathol. – 2010; 23 (Suppl.): 133A.