

Иммуногистохимическое исследование Ki-67 в различных аденомах гипофиза в зависимости от их гормонального профиля

Воробьева О.М., Рязанов П.А., Коновалов П.В., Митрофанова Л.Б.

ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия, 197341

Ключевые слова: *гормональные типы аденом гипофиза, прогностические факторы, иммуногистохимическое исследование, Ki-67.*

Резюме:

Поиск прогностических критериев в онкологии является одним из ключевых направлений исследования, значимую роль в котором отводится морфологическим и иммуногистохимическим критериям. *Цель:* определить значимость уровня пролиферативной активности по ki-67 как прогностического критерия клинического поведения аденом гипофиза. *Материалы и методы:* анализ операционного материала и медицинской документации 142 пациентов с аденомами гипофиза. Проводилось стандартное гистологическое исследование с окраской гематоксилином и эозином и иммуногистохимическое исследование с антителами к ki-67 и 6 гормонам аденогипофиза: пролактину, адренокортикальному гормону (АКТГ), соматотропному гормону (СТГ), тиреотропному гормону (ТТГ), фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) и лютеинизирующему гормону (ЛГ). *Результаты:* в исследуемой группе преобладали макроаденомы над микроаденомами, а в обеих группах – маммосоматотропиномы. Не было выявлено значимых различий по ki-67 между макроаденомами и микроаденомами. Рецидивировавшие аденомы имели больший размер по сравнению с нерецидивировавшими, но значимых различий в уровнях ki-67 между этими двумя группами не было выявлено. Аденомы с инвазией были более крупные и имели более высокие значения ki-67, чем образования без инвазии. Индекс пролиферативной активности ki-67 более 2,6% может быть оценен как прогностический критерий инвазивного роста только для гонадотропином. *Заключение:* Роль ki-67 как прогностического критерия для аденом гипофиза весьма ограничена, как по данным нашего исследования, так и по данным зарубежных авторов.

Immunohistochemical study of Ki-67 in various adenomas of the pituitary gland depending on their hormonal profile.

Vorobyova OM, Ryazanov PA, Konovalov PV, Mitrofanova LB

Federal State Budgetary Institution "Almazov National Medical Research Centre" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia, 197341

Key words: hormonal types of the pituitary adenoma, prognostic factors, immunohistochemical study, Ki-67.

Resume

The search for prognostic criteria in oncology is one of the key areas of research. A significant role in this is assigned to the morphological and immunohistochemical criteria. *Objective:* to evaluate Ki-67 as a prognostic factor for various adenomas of the pituitary gland, depending on their hormonal profile. *Materials and methods:* analysis of surgical material and medical documentation of 142 patients with pituitary adenomas. A standard histological study was carried out with the staining of hematoxylin and eosin and an immunohistochemical study with antibodies to ki-67 and 6 hormones of adenohypophysis: prolactin, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). *Results:* macroadenomas predominated over the microadenomas, and in both this groups, mammosomatotropinomas predominated. There were no significant differences in ki-67 between macroadenomas and microadenomas. Recurrent adenomas were larger than non-recurring, but no significant differences in ki-67 levels between this two groups were detected. Adenomas with invasion were larger and had higher values of ki-67 than formations without infestation. The index of proliferative activity of ki-67 of more than 2.6% can be estimated as prognostic criterion of invasive growth only for gonadotropinomas. *Conclusion:* The role of ki-67 as a prognostic criterion for pituitary adenomas is very limited, both according to our research, and according to the data of foreign authors.

По классификации Всемирной Организации Здравоохранения опухоли (2004г), развившиеся непосредственно из ткани аденогипофиза, разделяют на [1]:

- 1) аденому гипофиза 8272/0;
- 2) атипическую аденому гипофиза 8272/1;
- 3) карциному гипофиза 8272/3.

Ни в одном из современных руководств не дано четкое определение характеристик, определяющих злокачественное течение аденом гипофиза, более того, до сих пор не выработано однозначного отношения к диагнозу карциномы гипофиза. Следует подчеркнуть, что в четвертом издании ВОЗ посвященном опухолям эндокринной системы диагноз атипическая аденома, под которым подразумевалась аденома гипофиза с пролиферативной активностью более 3%, был исключен из классификации [2].

Также аденомы можно разделить по их гормональному профилю на:

- 1) пролактиномы;
- 2) соматотропиномы;
- 3) маммосоматотропиномы;
- 4) кортикотропиномы;
- 5) гонадотропиномы;
- 6) тиреотропиномы;
- 7) плюригормональные аденомы;
- 8) нулевоклеточные аденомы

Поиск прогностических критериев для аденом гипофиза идет уже давно. Не оправдали себя попытки связать гистотип аденомы, количество митозов, а также тип продуцируемого ею гормона с прогнозом для пациента [3].

Цель исследования: оценить Ki-67 в качестве фактора прогноза для различных аденом гипофиза в зависимости от их гормонального профиля.

Материалы и методы:

Был проведен анализ операционного материала и медицинской документации 142 пациентов с аденомами гипофиза, прооперированных через трансназальный доступ в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». Средний возраст пациентов составил 49 ± 14 лет с распределением по полу 36,6% мужчин и 63,4% женщин. Анализировались клиническое течение заболевания, уровень гормонов в крови и результаты лучевых методов исследования (размер опухоли и наличие инвазии). Проводилось стандартное гистологическое исследование с окраской гематоксилином и эозином и иммуногистохимическое исследование с антителами к ki-67 и 6 гормонам аденогипофиза: пролактину, аденокортикотропному гормону (АКТГ), соматотропному гормону (СТГ), тиреотропному гормону (ТТГ), фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) и лютеинизирующему гормону (ЛГ).

Результаты исследования:

Средний размер опухоли был $21,7 \pm 12$ мм, среди них 87,4% макроаденом ($n=124$) и 12,6% микроаденом ($n=18$). Рецидивировали новообразования у 17 пациентов (11,9 %), а инвазивный рост наблюдался в 32 случаях (22%).

При сравнении групп макроаденом и микроаденом средний размер макроаденом составил $24,3 \pm 11,3$ мм, а микроаденом - $6,5 \pm 3,1$ мм. В этих двух группах значительно различалась частота рецидивов: 12% в группе микроаденом и 88% в группе макроаденом. Выраженное различие также было найдено в частоте инвазивного роста микроаденом и макроаденом: 3% и 97% соответственно. Следует отметить факт, что при таких значимых различиях в клиническом течении этих двух групп новообразований, не наблюдалось статистически значимых различий в уровне пролиферативной активности: ki-67 $2,5 \pm 2,1\%$ в микроаденомах и $2,2 \pm 2,1\%$ в макроаденомах. Среди микроаденом преобладали маммосоматотропиномы – (44,4%; $n=8$), за ними следовали кортикотропиномы (33,3%; $n=6$), пролактиномы (11,1%; $n=2$) и соматотропинома (5,5%; $n=1$).

Среди макроаденом также преобладали маммосоматотропиномы (37,9%; n=47), за ними следовали гонадотропиномы (33%; n=41), кортикотропиномы (8,8%; n=11), гормонально-неактивные аденомы (8%; n=10), пролактиномы (6,4%; n=8), плюригормональные аденомы (4%; n=5) и соматотропиномы (1,6%; n=2).

Все клинические случаи были разделены на 2 группы: «молчащие» аденомы (21,8%, n=31) и гормонально-активные аденомы гипофиза (78,6%, n=111). «Молчащие» аденомы имели более крупный размер ($28,6 \pm 12$ мм) по сравнению с гормонально-активными ($21,8 \pm 11$ мм, $p=0,02$). В группе «молчащих» опухолей значительно преобладали гонадотропиномы (74%; n=23). Другие образования наблюдались значительно реже: маммосоматотропиномы (12,9%; n=4), пролактиномы (9,6%; n=3) и кортикотропинома (3,2%; n=1) (рис. 1).



Рисунок 1. Варианты «молчащих» аденом.

В группе гормонально-активных аденом преобладали соматотропиномы (49,5%; n=53), далее — гонадотропиномы (29,3%; n=33), кортикотропиномы (13,5%; n=15), пролактиномы (7,2%; n=8), соматотропиномы (1,8%; n=2) (рис. 2).

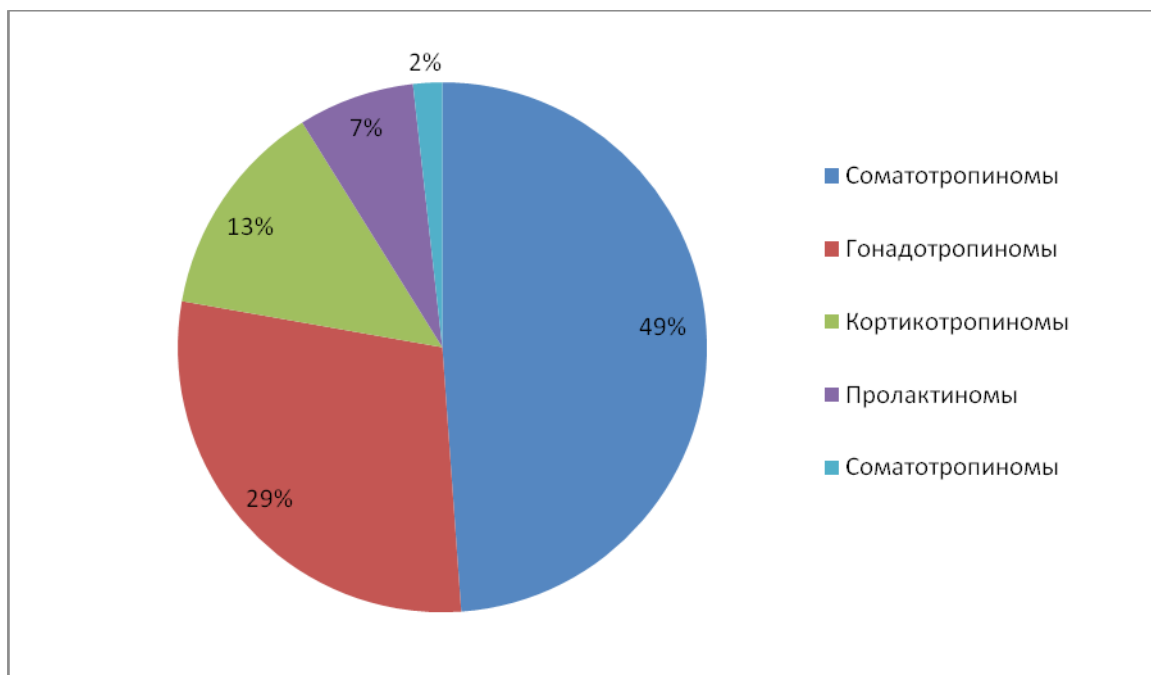


Рисунок 2. Варианты гормонально-активных аденом.

Рецидивировавшие аденомы имели больший размер ($29,9 \pm 14$ мм) по сравнению с нерецидивирующими ($17,6 \pm 10$ мм, $p=0,0008$). При этом статистически достоверной разницы по пролиферативной активности между этими двумя группами не было.

Аденомы с инвазией были более крупные ($28,6 \pm 13$ мм), чем образования без инвазии (18 ± 10 мм, $p=0,0004$). Различие в уровнях пролиферативной активности между этими двумя группами ($2,3 \pm 1,6\%$ и $1,5 \pm 1,3\%$ при $p=0,04$ соответственно) статистически достоверно.

При сравнении групп инвазивных и неинвазивных аденом было выявлено, что в обеих группах значимую долю составляли гонадотропиномы (Рис. 3). Было произведено сравнение между инвазивными и неинвазивными гонадотропиномами. Оказалось, что пролиферативная активность инвазивных гонадотропином ($2,6 \pm 1,6\%$) достоверно выше, чем неинвазивных ($1,5 \pm 1,3\%$; $p<0,03$).

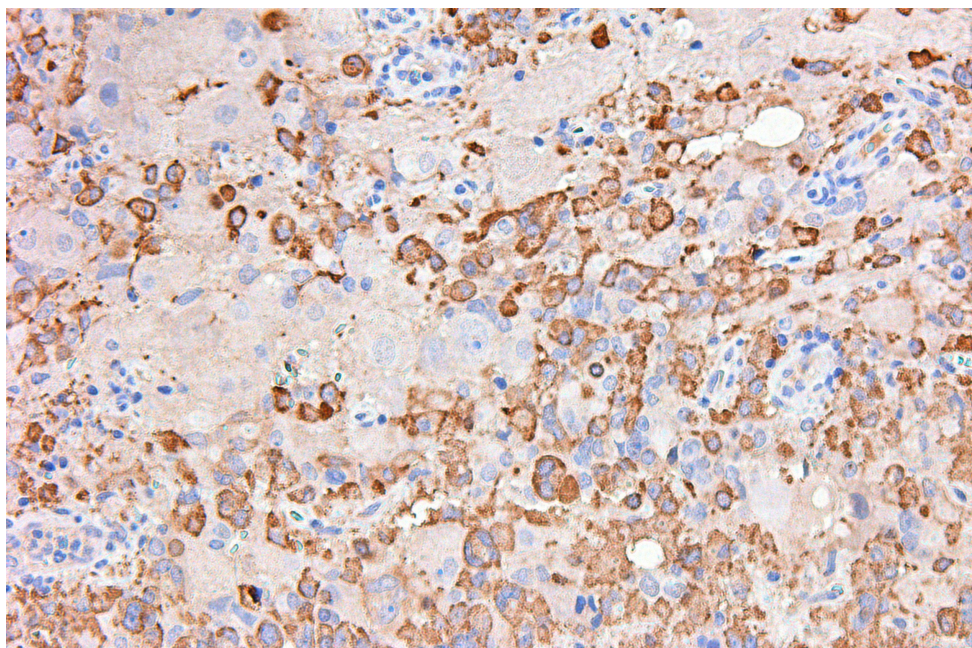


Рисунок 3. Иммуногистохимическое исследование аденомы гипофиза с фолликулостимулирующим гормоном; x200.

Обсуждение:

Несмотря на кажущуюся морфологическую простоту диагноза аденомы гипофиза, ни в одном из современных руководств не дано четкое определение характеристик, определяющих ее злокачественное течение. Поиск прогностических маркеров для этих образований осуществляется давно и не очень успешно.

Логичным шагом была оценка взаимосвязи уровня пролиферативной активности ki-67 и размером опухоли, ее инвазивным ростом и частотой рецидивов. Мы не выявили связи повышения уровня экспрессии ki-67 с размером аденомы или ее рецидивом в отличие от Salehi F. et al [4], которые обнаружили такую зависимость. Тем не менее, авторами не было обнаружено значимых различий в ki-67 между инвазивными и неинвазивными аденомами, аденомами и карциномами гипофиза. Sav A. et al [5] связывают частоту инвазивного роста аденом с повышенной экспрессией p53. По данным других авторов уровень экспрессии p53 и c-erbB2 не влияет на частоту инвазий аденом гипофиза. В тоже время у молодых пациентов наблюдается более высокий индекс ki-67 (>10%) и p53 (>25%). Распространение в третий желудочек также связывают с более

высоким p53, но этот факт не зависит от уровня ki-67 и c-erbB2. Описывают более высокий p53 в пролактиномах [6]. По мнению Ozer E. p53 более 25%, возможно, ассоциирован с рецидивами или продолженным ростом [7]. При исследовании Witek P. et al 59 случаев кортикотропином больший размер опухоли был связан с высокими ki-67 и p53 [8]. Следовательно, ki-67 не может быть использован как основной прогностический фактор без учета дополнительных критериев [9].

Наше исследование показало, что ki-67 может быть оценен как прогностический критерий инвазивного роста только для гонадотропином. В литературе есть подобные сведения о влиянии гормонального профиля опухоли на ее пролиферативную активность. Считается, что «молчащие» соматотропиномы имеют больший размер и тенденцию к инвазивному росту. Некоторые из них проявляют черты агрессивного течения со множеством рецидивов и устойчивы к темодалу. Пролактиномы у мужчин чаще имеют инвазивный рост и более устойчивы к антагонистам дофамина, чем такие же опухоли у женщин [10]. В нашем исследовании во всех изученных случаях гонадотропиномы были макроаденомами и рецидивировали. Возможно, этот факт был связан и с тем, что клинически опухоли себя долго не проявляли, а трансфеноидальная резекция была неполной.

В результате одного из самых масштабных исследований аденом гипофиза, которое проводилось в течение 8 лет и включало в себя 410 случаев, была предложена клинкоморфологическая классификация аденом гипофиза, учитывающая 3 характеристики:

- 1) Размер опухоли (микроаденома до 10мм, макроаденома - 10-40мм и гигантская аденома - более 40мм);
- 2) Тип опухоли по продуцируемому гормону, определяемый иммуногистохимическим методом;
- 3) Grade опухоли оценивается по:
 - инвазии, определяемой гистологически и/или с помощью магнитно-резонансной томографии, в кавернозные или крыловидные синусы

- пролиферации, которая считается повышенной при наличии как минимум двух из трех критериев (ki-67 более 3%, митозы более 2 на 10 полей зрения при увеличении 40, позитивный p53 в более 10 ядрах на 10 полей зрения).

Авторы выделили следующие уровни злокачественности аденом гипофиза, которые имели достоверную взаимосвязь с прогнозом для пациента:

Grade 1a: неинвазивная опухоль;

Grade 1b: неинвазивная опухоль с повышенной пролиферацией;

Grade 2a: инвазивная опухоль;

Grade 2b: инвазивная опухоль с повышенной пролиферацией;

Grade 3: метастазировавшая опухоль (цереброспинальные или системные метастазы) [11].

В роли прогностических критериев также предлагают использовать и другие менее популярные антитела к: 1) p27 KIP1-циклин-зависимому ингибитору киназ, вовлеченному в регуляцию клеточного цикла, 2) циклооксигеназе-2 (COX-2) - ключевому ферменту синтеза простагландина, 3) галектину-3, 4) трансформирующему опухоли гипофиза гену (Pituitary Tumor-transforming Gene – PTTG), 5) фактору роста сосудистого эндотелия VEGF [12, 13, 14, 15, 16].

Циклооксигеназа-2 (COX-2) - ключевой фермент синтеза простагландина, вовлеченный не только в воспалительный ответ, но и в процессы опухолевой инвазии и ангиогенеза. Повышенная экспрессия COX-2 наблюдалась в карциномах гипофиза. Образования, экспрессирующие СТГ, пролактин, ТТГ и гонадотропиномы у женщин показывали более низкое значение COX-2, чем в гонадотропинах у мужчин, онкоцитомах и нулевоклеточных аденомах.

Экспрессия галектина-3 наблюдалась только в опухолях, продуцирующих пролактин и АКТГ. При этом уровень экспрессии галектина-3 был выше в АКТГ-продуцирующих карциномах.

Экспрессия PTTG индуцируется эстрогенами и стимулирует выработку базового фактора роста фибробластов. PTTG стимулирует ангиогенез.

Экспрессия VEGF связана с ангиогенезом и агрессивным поведением опухоли. Хотя этот фактор не имеет прямого влияния на инвазию опухоли, он может регулировать сигнальные пути, которые способствуют увеличению опухолевого объема.

Таки образом, наше исследование и обзор литературных данных показали, что биологический потенциал аденом гипофиза зависит и от гормонального профиля опухоли.

Заключение

Таким образом, наше исследование показало, что индекс пролиферативной активности ki-67 не является адекватным прогностическим фактором для аденом гипофиза в целом и может быть использован только для оценки биологического потенциала гонадотропином.

Список литературы:

- 1) DeLellis R.A, Lloyd R.V., Heitz P.U., Eng C. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics Numors of Endocrine Organs. IARC Press: Lyon, 2004. – 320 p.
- 2) Lloyd R.V., Osamura, R.Y., Klöppel G., Rosai J. WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs. 4th ed., IARC Press: Lyon, 2017. – 355 p.
- 3) Улитин А.Ю. Гигантские аденомы гипофиза особенности клиники и течения. Автореф. дис. д. мед. наук – СПб, 2008. – 45 с.
- 4) Salehi F., Agur A., Scheithauer B.W. et al. Ki-67 in pituitary neoplasms: a review--part I . Neurosurgery. 2009; 65(3): 429-37.
- 5) Sav A., Rotondo F., Syro L.V. et al. Biomarkers of pituitary neoplasms. Anticancer Res. 2012; 32(11): 4639-54.
- 6) Zakir J.O., Casulari L.A., Rosa J.W. et al. Prognostic Value of Invasion, Markers of Proliferation, and Classification of Giant Pituitary Tumors, in a Georeferred Cohort in Brazil of 50 Patients, with a Long-Term Postoperative Follow-Up. Int J Endocrinol. 2016; 2016: 7964523.

- 7) Ozer, E. Expression of BCL-2, BAX and p53 proteins in pituitary adenomas: An immunohistochemical study / E. Ozer, M.S. Canda, C. Ulukus [et al.] // Tumori. – 2003. – Vol. 89, iss. 1. –P. 54-59.
- 8) Witek P., Zielinski G., Szamotulska K. et al. Clinicopathological predictive factors in the early remission of corticotroph pituitary macroadenomas in a tertiary referral centre. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4): 539-49.
- 9) Aguiar P.H., Aires R., Laws E.R. et al. Labeling index in pituitary adenomas evaluated by means of MIB-1: is there a prognostic role? A critical review. *Neurol Res.* 2010; 32(10): 1060-71.
- 10) Raverot G., Vasiljevic A., Jouanneau E. et al. A prognostic clinicopathologic classification of pituitary endocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015; 44(1): 11-8.
- 11) Trouillas J., Roy P., Sturm N. et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol.* 2013;126(1): 123-35.
- 12) Korbonits M., Chahal H.S., Kaltsas G. et al. Expression of phosphorylated p27(KIP1) protein and JUN activation domain-binding protein 1 in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(6): 2635-2643.
- 13) Bloomer C.W., Kenyon L, Hammond E, Hyslop T. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human pituitary macroadenomas. *Am J Clin Oncol.* 2003; 26(4): 75-80.
- 14) Riss D., Jin L., Qian X. et al. Differential expression of galectin-3 in pituitary tumors. *Cancer Res.* 2003;63(9): 2251-2255.
- 15) Filippella M., Galland F., Kujas M. et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006; 65(4): 536-543.
- 16) Fukui S., Nawashiro H., Otani N. et al. Vascular endothelial growth factor expression in pituitary adenomas. *Acta Neurochir Suppl.* 2006;86: 519-521.