

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Wojskowo – Lekarski
Międzywydziałowa Katedra Diagnostyki
Laboratoryjnej i Molekularnej
Zakład Neuroendokrynologii

Joanna Toszek

**„Ocena zależności pomiędzy przedoperacyjnym stężeniem IGF–1
a fenotypem immunohistochemicznym gruczolaka przysadki
u pacjentów z akromegalią”**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: *prof. dr hab. n. med. Katarzyna Winczyk*

Łódź, 2019

SUMMARY

Acromegaly is a disease caused by excessive secretion of growth hormone by pituitary adenoma. Currently, laboratory diagnostics of acromegaly is based on the determination of the insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) in the patient's blood and the growth hormone (GH) in the oral glucose tolerance test. Assumptions about the hormonal phenotype of the tumor can be based on the results of laboratory findings but the actual pituitary adenoma profile is possible only on postoperative immunohistochemical assessment. It is known that except monohormonal adenomas synthesizing only GH, acromegaly can be caused by *somatoprolactinoma* or *adenoma plurihormonale*. Immunohistochemical assessment of the hormonal phenotype and adenoma growth factors – mainly Ki-67 antigen and others, such as prothymosin α (ProT α) and follitropin receptor (FSHR), has important prognostic significance and in patients with acromegaly allows to personalize the postoperative management procedure.

The aim of the study:

The main goal of my work was a comparative analysis of the preoperative concentration of IGF-1 in the blood of patients with acromegaly with the postoperative immunohistochemical hormonal phenotype. In addition, I assessed the growth factors of adenomas, the proliferation index Ki-67, ProT α and FSHR, and compared them with the preoperative value of IGF-1. Considering that the positive GH reaction is present not only in adenomas displaying clinical symptoms of acromegaly but also in some *clinically nonfunctional pituitary adenomas* (CNFPA), the study also included patients with preoperatively diagnosed CNFPA, the tumors that give positive immunohistochemical examination on GH.

Materials and methods:

The study included two groups of patients – 22 subjects with acromegaly and 15 with *clinically nonfunctioning pituitary adenoma*. In the study group, there were patients with the determined preoperatively IGF-1 concentration. An additional criterion for inclusion into the study group was a positive growth hormone reaction in the postoperative immunohistochemistry. IGF-1 determination in patients' blood was performed by enzyme-enhanced chemiluminescence assay on the Immulite 1000 analyzer using the LGF1 kit; DPC / Siemens. The hormonal phenotype was assessed immunohistochemically using specific

polyclonal: anti-GH, anti-PRL, anti-ACTH and monoclonal: anti-LH, anti-FSH, anti-TSH, anti- α SU antibodies. The growth factors of tumors were assessed also immunohistochemically using antibodies: anti-Ki-67, anti-ProT α and anti-FSHR. All reactions were visualized using the Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase / DAB +, Rabbit / Mouse. Immunohistochemical reactions to the pituitary hormones were assessed in light microscopy, a test was considered positive when more than 5% of cells were stained. In turn, for the Ki-67 proliferation index and ProT α , the number of positive nuclei per 500 tumor cells was examined and the values were expressed in the form of percentages. Reactions to FSHR were assessed semi-quantitatively by determining their severity and the obtained results were presented using a four-point scale: negative, weak, moderate and strong.

Results:

Based on the assessment of the hormonal profile of the pituitary adenomas in patients with acromegaly, three immunohistochemical phenotypes were distinguished: *somatotropinoma*, diagnosed in four patients; *somatoprolactinoma* in seven patients and *adenoma plurihormonale* in 11. The analysis of preoperative IGF-1 concentrations showed that the total plasma IGF-1 concentration in all groups of patients with acromegaly was 1034.8 ng/mL – the highest in *somatoprolactinoma* (1480.5 ng/mL), the lowest in *somatotropinoma* (702 ng/mL). In turn, in the group of *clinically nonfunctioning pituitary tumors*, based on immunohistochemical examination, 13 cases were diagnosed as plurihormonal adenomas and two of them as "*silent*" *somatotropinoma* and "*silent*" *somatoprolactinoma*. The mean IGF-1 concentration in these patients was 151.7 ng/mL and in the majority of 13 subjects it was within the reference values for the patient's age. In pituitary adenomas from patients with acromegaly, the cell proliferation index in almost all (except two) tumors was less than 1%, and its values did not correlate with the preoperative IGF-1 concentration. A positive reaction to ProT α was noted in 79% of examined adenomas, but it was very diverse and did not differ statistically between IHC profiles. There was also no correlation between the percentage of positively stained nuclei on ProT α and the preoperative IGF-1 concentration. Positive reactions to FSHR were found in 89% of examined adenomas, but as in ProT α , no statistically significant correlation was found between FSHR and IGF-1 concentration. In the group of *clinically nonfunctioning pituitary adenomas*, there was also no correlation between Ki-67 and preoperative IGF-1 levels, and the average value of this index was slightly higher than in tumors from patients with acromegaly. Positive ProT α reactions were located in cell nuclei

of approximately 73% of assessed CNFPA. As in the case of Ki-67, no correlation was found between ProT α and the pre-operative IGF-1 concentration, and no statistical significance was observed between the severity of the FSHR reaction in CNFPA cells and the preoperative IGF-1 concentration in patients' blood.

Conclusions:

1. Pituitary adenomas with clinical signs of acromegaly show different hormonal profiles in immunohistochemistry – most of them are plurihormonal tumors, and less *somatoprolactinoma* and *somatotropinoma*.
2. *Clinically nonfunctioning pituitary adenomas* with a positive immunohistochemical reaction for growth hormone are usually plurihormonal tumors.
3. In patients with acromegaly, preoperative concentration of IGF-1 in the blood depends on the immunohistochemical phenotype of the tumor – the lowest values occur in patients with "*pure*" *somatotropinoma*, and definitely higher in patients with *somatoprolactinoma* and *plurihormonal adenoma*.
4. In patients with *clinically nonfunctioning pituitary adenomas* showing a positive immunohistochemical reaction to growth hormone, the preoperative IGF-1 concentration is usually within the reference range.
5. In both groups of examined pituitary adenomas, no correlation was found between the values of proliferation index Ki-67 and the preoperative IGF-1 blood concentration.
6. In pituitary adenomas, the reaction to prothymosin α is very diverse. Both in patients with acromegaly and in patients with *clinically nonfunctioning pituitary adenomas*, there was no statistically significant correlation between the prothymosin α reaction and the preoperative IGF-1 concentration.
7. Pituitary adenomas that show symptoms of acromegaly, especially macroadenomas, are characterized by a higher number of follicle-stimulating receptor (FSHR) cells than *clinically nonfunctioning pituitary adenomas* which are immunohistochemically positive for growth hormone. In the examined adenomas, there was no statistically significant correlation between the severity of the FSHR reaction and the preoperative IGF-1 concentration.

Final conclusion:

In patients with acromegaly, preoperative IGF-1 concentration is associated with the hormonal phenotype of the pituitary adenoma, while there is no relationship between IGF-1 level and immunohistochemical tumor growth rates – Ki-67 antigen, pTymosin α and follitropin receptor.

STRESZCZENIE

Akromegalia jest chorobą spowodowaną nadmiernym wydzielaniem hormonu wzrostu przez gruczolak przysadki. Obecnie diagnostyka laboratoryjna akromegalii opiera się na oznaczeniu we krwi chorego stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF-1) oraz hormonu wzrostu (GH) w teście doustnego obciążenia glukozą. Jakkolwiek przypuszczenia dotyczące fenotypu hormonalnego guza mogą być stawiane na podstawie wyników badań laboratoryjnych, jednakże ustalenie rzeczywistego profilu gruczolaka przysadki możliwe jest dopiero na podstawie pooperacyjnej oceny immunohistochemicznej. Wiadomo bowiem, że oprócz gruczolaków monohormalnych syntezujących jedynie GH, przyczyną akromegalii mogą być gruczolaki o typie *somatoprolactinoma* lub wielohormalne. Ocena immunohistochemiczna fenotypu hormonalnego oraz wskaźników wzrostu gruczolaka – głównie antygenu Ki-67 oraz innych, takich jak protymozyna α (ProT α) i receptor dla folitropiny (FSHR), posiada istotne znaczenie rokownicze i u pacjenta z akromegalią pozwala na personalizację postępowania pooperacyjnego.

Cel pracy:

Głównym celem mojej pracy była więc analiza porównawcza przedoperacyjnego stężenia IGF-1 we krwi chorego z akromegalią z fenotypem hormonalnym guza przysadki określonym w pooperacyjnym badaniu immunohistochemicznym. Dodatkowo, oceniłam wskaźniki potencjału wzrostowego gruczolaka – wskaźnik proliferacji Ki-67, ProT α i FSHR oraz dokonałam ich porównania z wartościami stężenia IGF-1 przed operacją. Biorąc pod uwagę, że dodatni odczyn na GH obecny jest nie tylko w gruczolakach dających kliniczne objawy akromegalii, ale również w części guzów przysadki klinicznie nieczynnych hormonalnie (CNFPA) do badania włączono także chorych z rozpoznanym przedoperacyjnie CNFPA, u których badanie immunohistochemiczne guza wykazało dodatni odczyn na GH.

Materialy i metody:

Badaniem objęto dwie grupy pacjentów – 22 osoby z akromegalią oraz 15 chorych z gruczolakiem przysadki klinicznie nieczynnym hormonalnie. Do grupy badanej zakwalifikowano osoby, u których przedoperacyjnie oznaczono stężenie IGF-1. Dodatkowym kryterium włączenia do badania był pozytywny odczyn na hormon wzrostu w pooperacyjnym badaniu immunohistochemicznym. Oznaczenia IGF-1 we krwi pacjentów zostały wykonane metodą chemiluminescencji wzmocnionej enzymatycznie na analizatorze Immulite 1000

z wykorzystaniem zestawu LGF1; DPC/Siemens. Profil hormonalny oceniono immunohistochemicznie stosując swoiste przeciwciała poliklonalne: anti-GH, anti-PRL, anti-ACTH oraz monoklonalne: anti-LH, anti-FSH, anti-TSH, anti- α SU. Do immunohistochemicznej oceny potencjału wzrostowego zastosowano przeciwciała: anti-Ki-67, anti-ProT α oraz anti-FSHR. Wizualizację reakcji przeprowadzono z użyciem zestawu Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse. Odczyny immunohistochemiczne na hormony przysadkowe oceniono w mikroskopie świetlnym, za wynik dodatni przyjęto odczyn pozytywny w ponad 5% komórek. Z kolei, dla wskaźnika proliferacji Ki-67 oraz dla ProT α zbadano ilość pozytywnych jąder na 500 komórek nowotworowych a wartości wyrażono w procentach. Reakcje na FSHR oceniono półilościowo określając nasilenie odczynów i uzyskane wyniki przedstawiono za pomocą czterostopniowej skali – odczyn ujemny, słaby, umiarkowany oraz silny.

Wyniki:

Na podstawie oceny profilu hormonalnego gruczolaków przysadki u pacjentów z akromegalią wyodrębniono trzy fenotypy immunohistochemiczne – *somatotropinoma*, rozpoznany u czterech chorych, *somatoprolactinoma* u siedmiu osób oraz *adenoma plurihormonale* u 11. Analiza przedoperacyjnych stężeń IGF-1 wykazała, że średnie osoczowe stężenie IGF-1 w całej grupie chorych z akromegalią wynosiło 1034,8 ng/mL – najwyższe w *somatoprolactinoma* (1480,5 ng/mL), najniższe *somatotropinoma* (702 ng/mL). Z kolei, w grupie guzów klinicznie nieczynnych hormonalnie, na podstawie badania immunohistochemicznego, w 13 przypadkach zdiagnozowano gruczolaki wielohormonalne, w dwóch pozostałych – „*silent*” *somatotropinoma* oraz „*silent*” *somatoprolactinoma*. Średnie stężenie IGF-1 u tych chorych wynosiło 151,7 ng/mL i u większości – 13 osób mieściło się w granicach wartości referencyjnych dla wieku pacjenta. W gruczolakach przysadki pochodzących od pacjentów z akromegalią wskaźnik proliferacji komórkowej był w prawie wszystkich (z wyjątkiem dwóch) guzach poniżej 1%, a jego wartości nie korelowały z przedoperacyjnymi stężeniami IGF-1. Dodatni odczyn na ProT α odnotowano w 79% badanych gruczolaków, ale był on bardzo zróżnicowany i nie różnił się statystycznie pomiędzy profilami IHC. Nie odnotowano także zależności pomiędzy procentem wybarwionych pozytywnie jąder na ProT α a przedoperacyjnym stężeniem IGF-1. Odczyny dodatnie na FSHR stwierdzono w 89% badanych gruczolakach, ale podobnie jak w ProT α nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji pomiędzy FSHR i stężeniem IGF-1. W grupie guzów klinicznie nieczynnych hormonalnie również nie zachodziła korelacja

między Ki-67 a przedoperacyjnymi stężeniami IGF-1, a średnia wartość tego wskaźnika była nieco wyższa niż w guzach pochodzących od chorych z akromegalią. Pozytywne odczyny na ProTα zlokalizowano w jądrach komórkowych w około 73% ocenianych CNFPA. Podobnie jak w przypadku Ki-67 nie wykazano korelacji pomiędzy wartością ProTα a przedoperacyjnym stężeniem IGF-1, również nie stwierdzono zależności pomiędzy nasileniem odczynu na FSHR w komórkach CNFPA, a przedoperacyjnym stężeniem IGF-1 we krwi pacjentów.

Wnioski:

1. Gruczolaki przysadki dające kliniczne objawy akromegalii wykazują w badaniu immunohistochemicznym różne profile hormonalne – najczęściej są to guzy wielohormonalne, a rzadziej gruczolaki somatoprolaktynowe i monohormonalne guzy somatotropowe.
2. Gruczolaki klinicznie nieczynne hormonalnie z dodatnim odczynem na hormon wzrostu w ocenie immunohistochemicznej są zazwyczaj guzami wielohormonalnymi.
3. U chorych z akromegalią przedoperacyjne stężenie IGF-1 we krwi, zależy od fenotypu immunohistochemicznego guza – najniższe wartości występują u osób z tzw. „czystym” gruczolakiem somatotropowym, a zdecydowanie wyższe u chorych z *somatoprolactinoma* i gruczolakiem wielohormonalnym.
4. U osób z gruczolakami klinicznie nieczynnymi hormonalnie wykazującymi dodatni odczyn immunohistochemiczny na hormon wzrostu przedoperacyjne stężenie IGF-1 mieści się zazwyczaj w zakresie referencyjnym.
5. W obu grupach badanych gruczolaków przysadki nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami wskaźnika proliferacji Ki-67 a przedoperacyjnymi stężeniami IGF-1 we krwi chorych.
6. W gruczolakach przysadki odczyn na protymozynę α wykazuje bardzo zróżnicowane nasilenie. Zarówno u pacjentów z akromegalią jak i u chorych z gruczolakami klinicznie nieczynnymi hormonalnie nie stwierdzono statystycznej zależności pomiędzy odczynem na protymozynę α i przedoperacyjnym stężeniem IGF-1.
7. Gruczolaki przysadki dające objawy akromegalii, szczególnie makrogruczolaki, charakteryzują się większą ilością komórek posiadających receptory dla folikulotropiny (FSHR) niż gruczolaki klinicznie nieczynne hormonalnie z dodatnim odczynem immunohistochemicznym na hormon wzrostu. W badanych

gruczolakach nie stwierdzono statystycznej zależności pomiędzy nasileniem odczynu na FSHR a przedoperacyjnym stężeniem IGF-1.

Wniosek końcowy:

U chorych z akromegalią przedoperacyjne stężenie IGF-1 jest związane z fenotypem hormonalnym gruczolaka przysadki, natomiast nie ma zależności pomiędzy stężeniami IGF-1 i immunohistochemicznymi wskaźnikami wzrostu guza – antygenem Ki-67, protymozyną α i receptorem dla folitropiny.