

Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale al Republicii Moldova

**INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU"**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 616.432-006.55-074(043.2)

MELNIC EUGEN

**PROFILUL HORMONAL ȘI MARKERI MOLECULARI
PREDICTIVI PENTRU EVOLUȚIA ȘI TERAPIA
ADENOAMELOR HIPOFIZARE**

311.02 – Anatomia patologică

Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

CHIȘINĂU, 2018

Teza a fost elaborată la Catedra de morfopatologie a Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova.

Consultanți științifici:

Raica Marius – dr., profesor universitar, UMF "Victor Babeș", Timișoara, România
Șaptefrați Lilian – dr. hab. șt. med., conf. univ.

Referenți oficiali:

Haidarlî Ion – dr. hab. șt. med., prof. cercet.
Timar Romulus – dr., prof. univ. (România)
Catereniuc Ilia – dr. hab. șt. med., prof. univ.

Componența Consiliului Științific Specializat:

Baciu Gheorghe, președinte, dr. hab. șt. med., prof. univ.
Fulga Veaceslav, secretar, dr. șt. med., conf. univ.
Rîvneac Victor, membru, dr. hab. șt. med., prof. univ.
Zapuhlîh Grigore, membru, dr. hab. șt. med., prof. univ.
Gavriliuc Mihail, membru, dr. hab. șt. med., prof. univ.
Pădure Andrei, membru, dr. hab. șt. med., conf. univ.
Becheanu Gabriel, membru, dr., prof. univ. (România)
Bogdanscaia Nina, membru, dr. hab. șt. med., conf. cercet.

Susținerea tezei va avea loc la 26 iunie 2018, ora 14.00 în ședința Consiliului științific specializat DH 50.311.02-01 din cadrul IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova (Bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004).

Teza de doctor habilitat și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova (Bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004) și pe pagina web a CNAA/ANACEC www.cnaa.md.

Autoreferatul a fost expediat la 24 mai 2018.

Secretar științific al Consiliului științific specializat:

dr. șt. med., conf. univ.

Fulga Veaceslav

Consultanți științifici:

dr., prof.univ.

Raica Marius

dr. hab. șt. med., conf. univ.

Șaptefrați Lilian

Autor:

Melnic Eugen

REPERE CONCEPTUALE ALE LUCRĂRII

Actualitatea temei

Tumorile glandei hipofizare și a regiunii selare reprezintă aproximativ 10 – 15% din tumorile cerebrale. Numeroase tipuri de tumori pot implica regiunea selară, reflectând anatomia sa complexă. Cele mai frecvent întâlnite tumori sunt adenoamele hipofizare, tumori epiteliale benigne derivate din celulele ale adenohipofizei. De fapt, adenoamele hipofizare reprezintă a treia entitate tumorală în practica neurochirurgicală, fiind devansate doar de gliome și meningioame. Adenoamele hipofizare reprezintă aproximativ 75% din leziunile selare, afectează predominant femeile între decadele a treia și a șasea, cu toate acestea, nici un grup de vârstă nu este cruțat. Acestea sunt mai puțin frecvente la copii și adolescenți, dar majoritatea dintre aceste tumori dezvoltate în copilărie sunt clinic funcționale și pot fi mult mai agresive [17].

De la epidemiologie la aspectele lor moleculare, adenoamele hipofizare reprezintă un spectru larg de tulburări care pot fi analizate și clasificate în funcție de secreția hormonală, aspectele clinice și tratament, ținând cont însă și de aspectele histopatologice și de microscopie electronică. Datorită metodelor moderne de studiu celular (imunohistochimie, microscopie electronică, hibridizare in-situ), nu mai este folosită vechea clasificare tinctorială a adenoamelor, aceasta fiind lipsită de informații privind secreția hormonală și activitatea biologică a celulelor tumorale [38, 49].

O bună parte din aceste tumori sunt “silenzioase”, subclinice, nefiind operate niciodată de neurochirurg, de aceea este foarte important să diferențiem incidentalomalele, care nu necesită tratament, de adenoamele hipofizare, care implică un diagnostic corect și o atitudine terapeutică, fie ea farmacologică, radioterapeutică sau chirurgicală [46].

În ciuda faptului că adenoamele sunt niște entități nozologice benigne, ele pot deveni severe, chiar amenințătoare de viață, prin invazie locală și compresiune sau prin complicații metabolice și cardiovasculare.

Situația în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare

Caracterizarea moleculară a adenoamelor hipofizare, extrem de necesară pentru identificarea factorilor cu posibil impact prognostic și terapeutic este extrem de puțin studiată. Cu excepția adenoamelor hipofizare GH și PRL secretante care au fost extensiv studiate din punct de vedere molecular, celelalte tipuri relativ rare, dar care prezintă o agresivitate înaltă comparativ cu precedentele cu efecte nefavorabile asupra profilului endocrin al întregului organism, nu au fost complet caracterizate din punct de vedere molecular.

Pe baza celor prezentate mai sus, prezenta lucrare a avut ca scop principal identificarea de noi factori cu rol prognostic și terapeutic prin studiul extensiv al factorilor de creștere puțin sau deloc studiați, cu posibilitatea de a stabili noi tendințe clinice diagnostice și terapeutice bazate pe aceste observații.

Totodată, diagnosticul histopatologic a evidențiat predominanța unor tipuri histopatologice particulare în zona Republicii Moldova, aspect care, pentru această zonă este important din punct de vedere epidemiologic.

Scopul lucrării:

Studiul factorilor moleculari cu rol predictiv și terapeutic abordați dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Caracteristica histopatologică, imunohistochimică și moleculară a adenoamelor hipofizare din Republica Moldova pentru identificarea unor factori noi de prognostic și a unor ținte terapeutice personalizate.

Obiective:

1. Evaluarea spectrului histopatologic al adenoamelor hipofizare din zona Republicii Moldova.
2. Realizarea profilului hormonal al adenoamelor hipofizare prin utilizarea imunohistochimiei pentru GH, prolactină, TSH, ACTH, FSH, LH.
3. Studiul concordanței diagnostice dintre aspectele imunohistochimice și histopatologie.
4. Identificarea rolului factorilor de creștere în patogeneza adenoamelor hipofizare.
5. Influența profilului hormonal asupra ratei de proliferare a adenoamelor hipofizare.
6. Studiul proteinei HER2 și a EGFR în raport cu profilul hormonal al adenoamelor hipofizare incluse în studiu.
7. Rolul proteinei S100 și a GFAP în prognosticul adenoamelor hipofizare.
8. Rolul hibridizării in situ în îmbunătățirea diagnosticului molecular al adenoamelor hipofizare.
9. Stabilirea unui protocol de evaluare diagnostică a adenoamelor hipofizare care să includă parametrii histopatologici, imunohistochimici și moleculari cu potențial impact prognostic și terapeutic.

Metodologia cercetării științifice

Pentru studiul de față am investigat 96 de cazuri (10 hipofize normale, obținute în timpul necropsiilor și 86 de cazuri diagnosticate cu adenom hipofizar, aflate în diferite stadii de evoluție clinică).

Metodele de investigație

- Biopsiile obținute au fost spălate în ser fiziologic, fixate în formalină tamponată la pH7.2 timp de 48-72 de ore, și incluzionate în parafină, după tehnica histologică uzuală, folosind sistemul automatizat și standardizat Thermo Shandon.
- S-a efectuat apoi secționare seriată la microtom (Shandon ME) (15 secțiuni/bloc, cu grosimea de 3 micrometri) pentru diagnosticul primar. Secțiunile au fost montate pe lame silanate plasate la termostat la 60°C timp de 60 de minute, apoi la 37°C timp de 24 de ore, pentru a asigura adeziunea secțiunilor la lame.
- Metoda morfologică a fost constituită din colorarea lamelor cu hematoxilină-eozină: lamele au fost imersionate în hematoxilină.
- Metodele imunohistochimice permit vizualizarea antigenelor proteice tisulare sau celulare. Se bazează pe imunoreactivitatea anticorpilor și proprietățile chimice ale enzimelor sau complexelor enzimatică care reacționează cu substraturi cromogenice necolorate, pentru a produce compuși finali colorați.

- Examinarea și analiza imaginilor microscopice s-a efectuat cu ajutorul microscopului optic Nikon Eclipse600
- Analiza statistică s-a realizat folosind software-ul SPSS, versiunea 13. Metodele statistice au inclus trei teste de corelație (teste Spearman, Kendall, și Pearson). O corelație semnificativă a fost luată în considerare pentru o valoare a $p < 0.05$.

Noutatea științifică și originalitatea rezultatelor obținute:

- Pentru prima dată a fost efectuat un studiu comparativ al profilului hormonal și markerii moleculari al adenoamelor hipofizare.
- S-a identificat o rată înaltă a cazurilor de adenoame hipofizare mixte cu asocieri rare acestea fiind net superioare mediei întâlnite în literatura de specialitate.
- S-a determinat prezența unor factor etiopatogenici particulari zonei de unde provin adenoamele hipofizare.
- În premieră a fost estimat și corelat rolul receptorilor hormoni pituitari și factorii de proliferare.
- Am detectat cel puțin 3 factori cu potențial rol de pronostic și tratament în adenoamele hipofizare.
- S-a realizat în premiera o analiză a structurii adenoamelor hipofizare în dependență de aria geografică.
- Am determinat punctul posibil de prodrom al dezvoltării adenoamelor hipofizare și anume celulele foliculostelate, care sunt cunoscute drept celule-stem hipofizare.

Rezultate principial noi pentru știință și practică:

- În premieră a fost argumentat profilului molecular în diferite patternuri de creștere de adenoame hipofizare și în mod special prin utilizarea anticorpilor monoclonali înalt specializați a fost posibilă stabilirea variantelor plurihormonale de adenoame hipofizare.
- Am stabilit particularitățile imunohistochemice a asocierilor hormonale extrem de rare (ACTH LH; TSH FSH) și specificul acestora pe teritoriul Republicii Moldova.
- Am determinat cel mai eficient marker predictiv tumoral, valorificarea căruia induce noi strategii de tratament ale tumorilor de hipofiză.

Semnificația teoretică

Rezultatele cercetării permit reevaluarea și completarea clasificării tumorilor de hipofiză. Stabilitatea receptorilor celulari vor duce la reevaluarea tacticii de diagnostic și tratament în practica endocrinologică și neuro-terapeutică, indicând necesitatea obligatorie de studiere imunohistochimică a adenoamelor hipofizare. Asocieri triple sau cvadrule identificate excepțional în lotul din Republica Moldova, ca fiind de o frecvență mai mare au completat profilul adenoamelor hipofizare. Diferențele menționate în lucrarea prezentă, generează întrebări cu privire la prezența unor factori etiologici sau epidemiologici regionali, identificarea cărora ar permite elaborarea măsurilor de profilaxie și management eficient al pacienților.

Valoarea aplicativă a lucrării

Stabilirea diagnosticului complet are un impact pronostic și terapeutic enorm, eficientizând terapia antitumorală specifică și permițând efectuarea unui tratament personalizat în adenoamele pituitare.

- Elaborarea unei noi tactici de diagnostic tratament a maladiilor hipofizare.
- Editarea ghidurilor și manualelor pentru studenți, rezidenți ai USMF "N.Testemițanu" și medici practici în cadrul educației medicale continue.

Principiile de bază prezentate pentru susținere

- Evaluarea complexă a tabloului morfologic și a profilului hormonal al adenoamelor hipofizare din punct de vedere aplicativ.
- Relevarea noilor aspecte cu privire la structura geografică în corelare cu cea morfologică a adenoamelor hipofizare în vederea determinării unor posibili factori inițiatori de mediu.
- Relevarea unor aspecte noi în clasificarea morfologică și imunohistochimică a adenoamelor hipofizare.
- Argumentarea recomandărilor pentru modificarea principiilor de diagnostic și tratament a adenoamelor hipofizare.

Implementarea rezultatelor obținute

Rezultatele obținute pot fi implementate în tratamentul personalizat și determinarea managementului și factorilor de pronostic a pacienților diagnosticați cu adenom hipofizar în cadrul secției de endocrinologie a Spitalului Clinic Republican; secțiilor de neurochirurgie și neurochirurgie oncologică; în procesul instructiv-educational la Catedrele de histologie, citologie și embriologie, morfopatologie, endocrinologie, neurologie și chirurgie oncologică ale USMF "Nicolae Testemițanu"

Aprobarea rezultatelor

Rezultatele obținute pe parcursul investigațiilor efectuate și concepțiile de bază ale tezei au fost comunicate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice:

1. A noua conferință internațională de patologie Anticancer research (Sithonia, 2014);
2. Ședința societății Patologilor din Republica Moldova (Chișinău, 2014);
3. Virchows Archiv. Al 27 European Congress of Pathology (Belgrade, 2015);
4. Prima conferință euroregională a doctoranzilor și tinerilor cercetători în domeniul biomedicinii (Timișoara, 2015);
5. Acta medica. Marisiensis al 14 National Symposium of Microscopic Morphology (Târgu Mureș, 2016);
6. Acta Endocrinologica. Common Congress of the Romanian Society of Endocrinology and Romanian Psychoneuroendocrine Society (Brașov, 2016);
7. Virchows Archiv. Al 28 European Congress of Pathology (Koln, 2016);

8. 19-th European Congress of Endocrinology (Lisbon 2017);
9. Cea de-a 68-a Conferință a Societății Neurochirurgilor din Germania și a 7-ea Conferință a Societății Britanice a Neurochirurgilor (Magdeburg, 2017);
10. Conferința aniversară a IMSP Spitalul Clinic Republican ”Timofei Moșneaga” la 200 ani de la fondare (Chisinau, 2017).

Teza a fost discutată și aprobată la ședința Catedrei morfopatologie a USMF ”Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 35 din 22.06.2017), ședința Seminarului Științific de Profil extern - UMF ”Victor Babeș”, Timișoara (proces verbal din 28.09.2017) și Seminarul Științific de Profil intern din cadrul USMF ”Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 16 din 09.11.2017).

Publicații la temă

Materialele tezei au fost reflectate în 26 publicații, dintre care într-o monografie, 16 articole științifice, 9 teze internaționale, 6 articole fără coautori și 17 în străinătate.

Sumarul compartimentelor de bază

Lucrarea este expusă pe 196 pagini. Teza are următoarea structură: introducere, revista literaturii, 6 capitole și discutarea rezultatelor obținute. Primul capitol reprezintă revista literaturii și conține date despre structura anatomo-histologică a hipofizei. Capitolul 2 cuprinde material și metode de cercetare. În capitolele următoare, consecutiv sunt expuse aspectele morfologice, imunohistochimice și moleculare ale adenoamelor hipofizare. Teza se finalizează cu concluzii generale, rezumatele în în limbile română, rusă și engleză, lista de abrevieri, și recomandări practice. Materialul tezei este ilustrat cu 2 tabele, 95 figuri. Bibliografia include 350 de surse.

Cuvinte cheie: hipofiza, adenom, patologie, histochimie, biologie celulară.

Key words: Pituitary, Adenoma, Pathology, Histochemistry, cell biology.

Ключевые слова: гипофиз, аденома, патология, гистохимия, клеточная биология.

CONȚINUTUL TEZEI

Repere morfo-funcționale ale hipofizei

Primul capitol relevă reperele morfo-funcționale ale hipofizei, dezvoltarea embriologică și histologică prezentând revista literaturii și conține date despre structura anatomo-histologică a hipofizei umane prin prisma noilor date de laborator. Aspectele histologice ale hipofizei normale sunt de cele mai multe ori studiate pe secțiuni histologice provenite de la alte specii și, într-o foarte mică măsură sunt descrise în literatură aspectele morfologice, celulare și moleculare ale hipofizei normale. Aceasta derivă din faptul că, țesutul hipofizar normal poate fi colectat autopsic în principal și, într-o mai mică măsură în urma intervențiilor chirurgicale pentru terapia adenoamelor hipofizare. Un număr de variații normale histologice a glandei hipofizare pot mima leziuni histopatologice. O atenție deosebită am acordat factorilor predictivi pentru diagnosticul și terapia adenoamelor hipofizare, implicării factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți în patologia adenoamelor hipofizare.

Material și metode de cercetare

În capitolul doi este descris spectrul larg de metode de investigație aplicate la diverse niveluri: microscopic, imunohistochimic și molecular prin utilizarea diferitor markeri și hibridizării in situ. Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare reprezintă, momentan, “standardul de aur” al diagnosticului adenoamelor hipofizare pe care se bazează tratamentul medicamentos al adenoamelor hipofizare asociat terapiei chirurgicale. Analiza statistică s-a realizat folosind software-ul SPSS, versiunea 13. Metodele statistice au inclus trei teste de corelație (teste Spearman, Kendall, și Pearson). O corelație semnificativă a fost luată în considerare pentru o valoare a $p < 0.05$.

Adenoamele hipofizare: histopatologie și profil molecular

Următorul capitol este dedicat histologiei și profilului molecular al adenoamelor de hipofiză cu evaluarea rezultatelor morfologice convenționale.

Adenoamele hipofizare au fost caracterizate prin dezorganizarea arhitecturală specifică a hipofizei normale și, prin predominanța sau absența unuia sau mai multor tipuri celulare specifice hipofizei normale. Din aceste motive, evaluarea histopatologică a avut drept criteriu de încadrare pattern-ul morfologic tumoral (difuz sau compact, papilar, trabecular, fusiform și alveolar), și tinctorialitatea celulelor din structura adenoamelor hipofizare (acidofile, bazofile, cromofobe).

Astfel, din cele 86 de cazuri de adenoame hipofizare, 31 au avut un pattern difuz (solid), (Figura 1a), 34 au fost de tip papilar (Figura 1b), 11 – de tip trabecular (Figura 1c), 3 au inclus arii cu celule fusiforme (Figura 1d), 7 au avut un aspect alveolar (Figura 1e) și 31 au avut un pattern mixt. Pentru pattern-ul mixt, am constatat următoarele variante: acidofil-bazofil (AB, Figura 1f), acidofil-cromofob (AC, Figura 1g) și bazofil-cromofob (BC, Figura 1h).

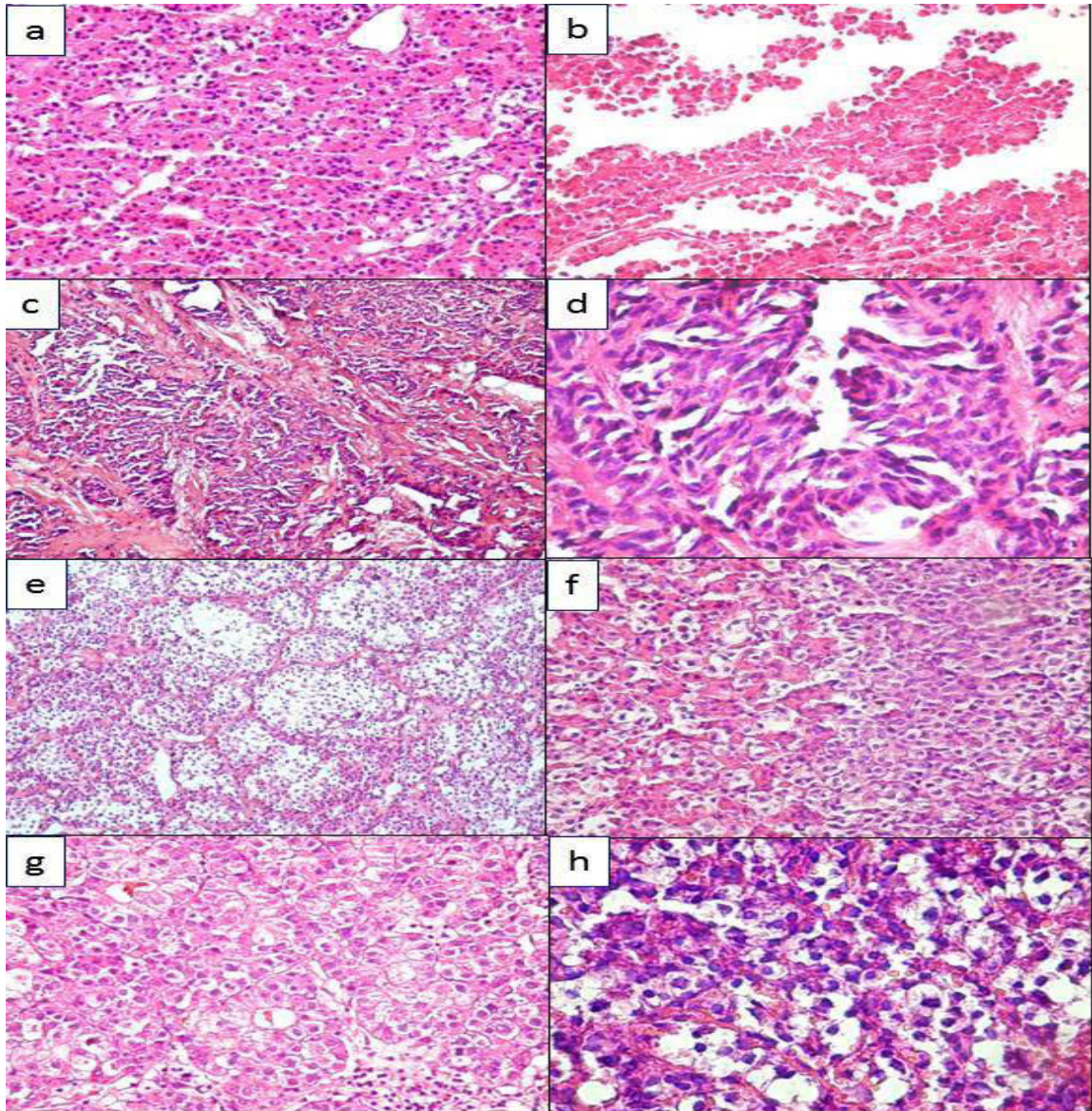


Fig.1. Pattern-uri de creștere în adenoamele hipofizare:
solid (a), papilar(b), trabecular(c), fusiform(d), alveolar (e)și mixt AB(f), AC(g) și BC(h)

Evaluarea histopatologică a adenoamelor hipofizare în funcție de tinctorialitatea celulară. Conform tinctorialității celulare, adenoamele hipofizare incluse în studiu au fost clasificate în acidofile, bazofile, cromofobe și mixte [41].

Din totalul de cazuri evaluate, 43% au fost de tip acidofil, 17% de tip bazofil, 18% de tip cromofob și 22% de tip mixt. Procentul și distribuția grafică a cazurilor studiate în raport cu tinctorialitatea celulelor componente poate fi redată schematic ca în Figura 2.

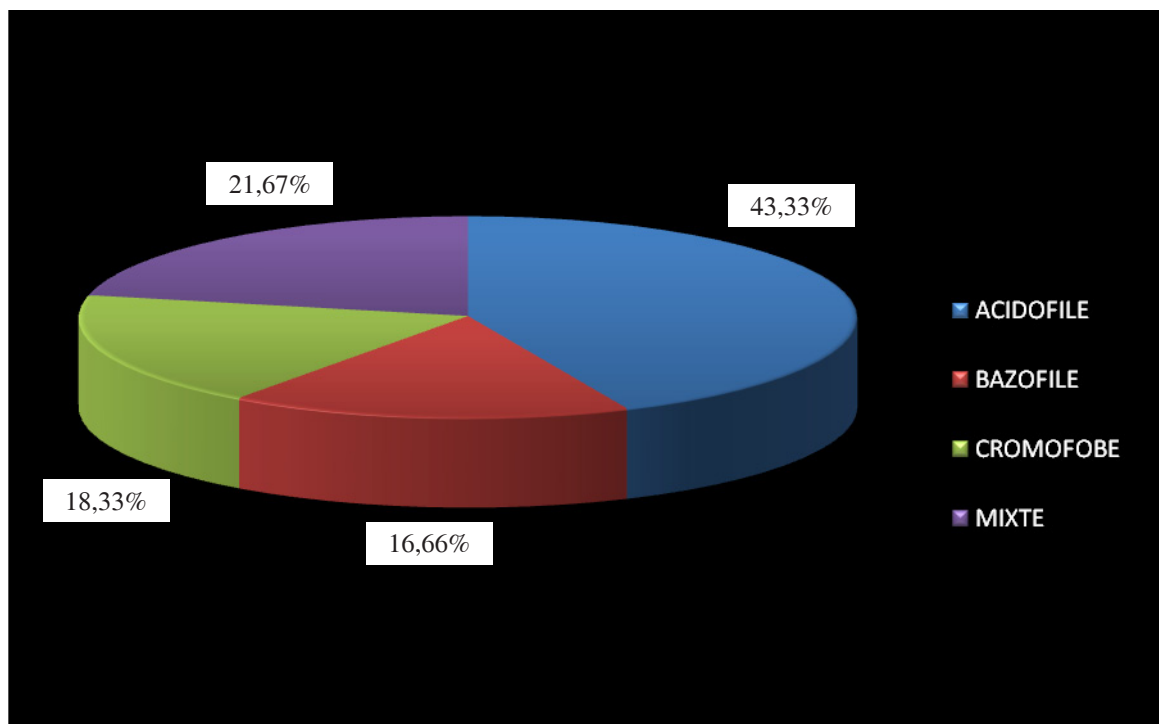


Fig.2. Procentul și distribuția grafică a cazurilor de adenoame hipofizare studiate în funcție de tinctorialitatea celulelor care intră în componența lor. De remarcat predominanța adenoamelor hipofizare de tip acidofil și mixt

Adenoamele hipofizare reprezintă aproximativ 10-15% din totalul tumorilor diagnosticate la nivel cerebral [5]. Afectează predominant femeile [62], iar prezența lor în copilărie este extrem de rară dar, atunci când există, astfel de tumori sunt mult mai agresive decât cele apărute în perioada adultă [31]. Clasificarea adenoamelor hipofizare doar pe baza diagnosticului histopatologic convențional nu mai este în prezent acceptată fără realizarea profilului hormonal prin metoda imunohistochimică. Totuși, diagnosticul inițial rămâne un aspect important în evaluarea adenoamelor hipofizare.

Morfologic, adenoamele hipofizare sunt constituite din celule acidofile, bazofile și cromofobe iar pentru adenoamele hipofizare mixte, combinații ale celor trei tipuri de celule pot fi întâlnite în proporții variabile.

Prin introducerea profilului hormonal al adenoamelor hipofizare bazat pe expresia apare să scadă în importanță, mai ales în centrele cu o dotare superioară a laboratoarelor de anatomie patologică.

Evaluarea histopatologică pe care am realizat-o în cadrul prezentului studiu a fost necesară din mai multe motive. Primul și, poate cel mai important este acela că, cercetarea de față reprezintă prima evaluare globală a adenoamelor hipofizare din Republica Moldova, inițial din punct de vedere morfologic, completat bineînțeles și de profilul hormonal, pe un număr de cazuri relativ mare.

Astfel, pattern-ul de creștere solid a fost caracterizat prin predominanța celulelor acidofile, și într-o mică măsură a celor cromofobe și bazofile. În schimb, adenoamele hipofizare de tip papilar

au fost constituite predominant din celulele bazofile. Tipul alveolar a inclus adenoamele hipofizare cu celule cromofobe predominant. În tipul trabecular, proporția celor trei tipuri celulare a fost aproximativ egală.

Tinctorialitatea celulară de tip acidofil a predominat în lotul inclus în studiu de adenoame hipofizare din aria Republicii Moldova. Aceasta este în concordanță cu datele raportate anterior de Bălinișteanu și colaboratorii care, dintr-un număr total de 142 adenoame hipofizare colectate din România, au diagnosticat 104 cazuri de adenoame de tip acidofil [4]. De asemenea, aceiași autori au prezentat pattern-ul de creștere solid ca fiind predominant în aproximativ 59% din totalul cazurilor, procent care este apropiat de cel găsit pentru cazurile colectate din Republica Moldova. Discordanțe în ceea ce privește celelalte pattern-uri de creștere s-au înregistrat pentru tipul papilar, acesta fiind mai frecvent în Republica Moldova, comparativ cu România. De asemenea, numărul cazurilor de adenoame hipofizare cu celule cromofobe a fost semnificativ mai ridicat pentru lotul studiat în Republica Moldova comparativ cu cel studiat pentru cazurile din România. Acest aspect de dominanță a celulelor cromofobe a fost raportat și de alți autori. În 1982, Felix și colaboratorii au raportat un număr de adenoame hipofizare cromofobe similar cu cel al adenoamelor cu celulele acidofile, aproximativ un procent de 30% din totalul cazurilor incluse în studiu [21] dar aceste date sunt extrem de rare.

Datele de mai sus sugerează influența tipului celular asupra pattern-ului de creștere al adenoamelor hipofizare. Autorii au demonstrat corelația dintre pattern-ul de creștere preoperator și postoperator precum și corelația dintre acesta și vârstă sau sex. Date despre aspectele de tinctorialitate celulară sau pattern de creștere histopatologic nu au fost citate în cadrul aceluiași studiu.

Clasificarea histopatologică dependentă de tinctorialitate sau pattern-ul de creștere a fost declarată ca fiind inefficientă datorită corelației slabe întâlnite între aspectele microscopice și profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Impactul slab al clasificării histopatologice convenționale nu a inclus însă corelația cu alți potențiali factori de prognostic și /sau terapeutici ce ar putea avea implicații în patogeneza adenoamelor hipofizare. Considerațiile inițiale conform cărora adenoamele hipofizare cu celule acidofile secretă predominant GH și cele cromofobe sunt non secretorii (nule) au fost demontate de profilul imunohistochemic care le-a contrazis parțial.

În prezent nu există date referitoare la corelația dintre indicele de proliferare, tipurile citologice și pattern-ul de creștere în adenoamele hipofizare.

Evaluarea imunohistochemică a inclus șase tipuri de hormoni: GH, PRL, ACTH, TSH, FSH și LH. Evaluarea microscopică și clasificarea adenoamelor hipofizare conform profilului hormonal s-a realizat pe contul procentului de celule pozitive și a intensității reacției.

Heterogenitatea celulară și funcțională a hipofizei normale s-a reflectat și în profilul hormonal al adenoamelor hipofizare incluse în studiul de față.

Expresia imunohistochemică a fiecărei asocieri este prezentată în Figura 3. Așa cum rezultă din descrierea de mai sus, cea mai frecventă asociere a fost realizată de GH care s-a co-exprimat practic cu toate celelalte tipuri de hormoni. Expresia GH a fost întotdeauna de intensitate moderată și mare în cadrul acestei asocieri în comparație cu ceilalți hormoni pentru care a predominat o

intensitate slabă, în foarte rare cazuri fiind întâlnită o intensitate moderată sau mare. În cadrul asocierilor dintre GH și alte tipuri de hormoni, s-a întâlnit un pattern de distribuție particular pentru asocierile GH-TSH și GH-ACTH.

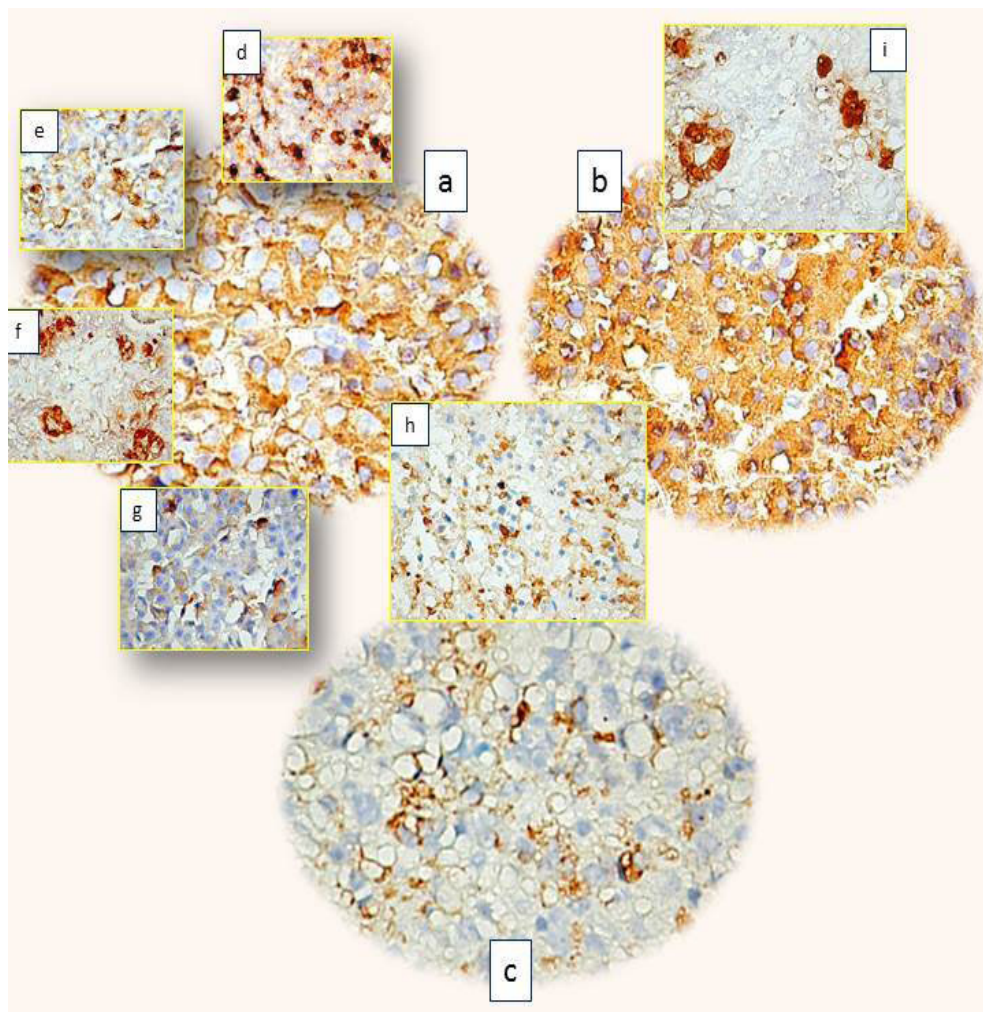


Fig.3. Expresia imunohistochimică a asocierilor întâlnite în cadrul adenoamelor hipofizare mixte care secretă două tipuri hormonale: GH-PRL (a, d), GH-TSH (a, e), GH-ACTH (a, f), GH-FSH (a, g) și GH-LH (a, h) PRL-LH (b, h), PRL-ACTH (b, i), și FSH-LH (c, h)

Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare este un pas obligatoriu în evaluarea tumorilor hipofizare cu un impact major în diagnosticul și terapia acestora [6, 44]. Practic, în acest moment, nu se mai acceptă ca diagnostic doar evaluarea histopatologică de tip convențional pe preparatele colorate cu metode de rutină. Datele din literatură referitoare la profilul hormonal al adenoamelor hipofizare sunt eterogene, tipurile hormonale descrise prezentând o mare variabilitate procentuală dependentă de numărul de cazuri sau aria geografică de unde provin. Bălinișteanu și colaboratorii, au raportat în 2011 un procent global de aproximativ 60% de adenoame hipofizare pure (secretante a unui singur tip hormonal) din lotul studiat în aria de sud a României [4]. În contrast, studiul nostru a relevat prezența unui procent de aproximativ 34% de adenoame hipofizare monosecretante prin analiza cazurilor din Republica Moldova. Mori și colaboratorii, în 2013 [53] au prezentat date rezultate din studiul unui număr de 242 adenoame hipofizare și au concluzionat că un procent

de 45% dintre acestea sunt monohormonale. Un procent relativ similar cu cel găsit în prezentul studiu a fost publicat de Shao și Li care au observat că, 37 % din adenoamele hipofizare sunt monohormonale [57]. Ca o particularitate a studiului nostru și respectiv ca o particularitate a adenoamelor hipofizare monosecretante din Republica Moldova, mai mult de jumătate dintre adenoamele hipofizare monosecretante au fost LH secretante [35, 36]. Celelalte studii au raportat că au predominat adenoamele secretante de GH și PRL, aspect care a fost observat și în studiul din România. Într-adevăr, adenoamele GH secretante au urmat pe cele secretante de LH, fiind urmate de cele PRL pozitive, aspecte care sunt în concordanță cu datele publicate anterior [4,6,53]. Adenoamele hipofizare mixte, caracterizate prin expresia imunohistochimică a doi hormoni hipofizari, au reprezentat un procent de 23% din totalul cazurilor incluse în studiu, în care au predominat asocierile de tip GH-PRL, aspect ce corespunde cu datele din literatură [53]. În prezent, persistă controverse legate de existența acestui tip de asociere în adenoamele hipofizare mixte. Datele din literatură au sugerat faptul că, un adenom hipofizar care inițial era PRL secretant să recidiveze sub forma unui adenom hipofizar GH secretant care a produs simptomatologie clinică specifică acromegaliei. Acest switch a fost explicat parțial prin prezența unei mutații a oncogenei *gsp*, mai concret Arg201His mutation în gena GNAS. Aceste modificări apărute în recidivele adenoamelor hipofizare au un impact major asupra terapiei și prognosticului acestora. Un alt aspect particular și incomplet elucidat în prezent vizează asocierea hormonală de tip GH-TSH. Datele prezente în literatură consideră aceste adenoame hipofizare mixte ca fiind foarte rare, procentul lor variind între 0,5-17% din totalul adenoamelor hipofizare [58]. Procentul de 5% găsit de noi pentru adenoamele hipofizare studiate se încadrează în limitele descrise în literatură. Acest tip de adenoame hipofizare mixte par să aibă un comportament agresiv, fiind caracterizate printr-o invazie crescută și un indice de proliferare ridicat, peste media specifică altor tipuri de adenoame hipofizare, cel mai probabil pe seama TSH .

Asocierea GH-ACTH în adenoamele hipofizare este considerată de asemenea o asociere foarte rară, două astfel de cazuri am evaluat în studiul nostru. Date relativ recente din literatură asociază o coexpresie similară cu mutații genice [54]. Evaluarea lor este sporadică în literatură fiind limitată doar la prezentarea unor cazuri clinice și, mult mai rar în cadrul unor studii de cercetare extensivă [6,155,186]. Un caz izolat a fost raportat de Zielinski și colaboratorii care au descris un adenom hipofizar GH-ACTH secretant dar, în care componentele GH și ACTH secretante au fost clar delimitate și situate în zone diferite, distincte ale adenohipofizei [70], prin punctarea acestui aspect, autorii sugerând de fapt prezența concomitentă a două tumori distincte la nivelul hipofizei. Asocierea hormonală de tipul PRL-ACTH a fost întâlnită în studiul nostru în 3% din cazuri, fapt care se integrează în cele raportate în literatură [50]. La fel de rară ca și precedentă, această asociere creează impedimente în ceea ce privește instituirea tratamentului corespunzător. Un studiu realizat prin co-cultivarea celulelor PRL secretante și acelor ACTH secretante care au fost tratate succesiv cu factori de tipul CRH sau TRH a demonstrat că stimularea secreției celor doi hormoni nu este echilibrată, aceasta fiind stimulată selectiv și dependent de tipul factorului utilizat. Astfel s-a demonstrat că modul de secreție al PRL în adenoamele mixte de tip PRL/ACTH este

diferit și răspunde diferit la terapiile aplicate comparativ cu secreția de PRL din prolactinoamele pure [69].

Majoritatea cazurilor clinice descrise în literatură și caracterizate de asocierea PRL cu ACTH au fost pacienți cu boala Cushing. În ciuda acestui aspect comun, modalitatea de debut clinic al adenoamelor hipofizare PRL/ACTH secretante a fost extrem de eterogen. Iaccovazzo și colaboratorii [28] au descris un caz al unui pacient de 60 de ani care a dezvoltat inițial un prolactinom, rezolvat prin terapie medicamentoasă, pentru ca ulterior, să prezinte simptome de boală Cushing cu certificarea prezenței unui adenom hipofizar ACTH secretant metacrom. Mittelbronn descrie cazul unui pacient cu simptomatologie clinică de boală Cushing dar cu prezența unui adenom hipofizar cu două componente distincte, PRL și ACTH secretante, certificate histologic și imunohistochimic. Delimitarea clară între zonele PRL și ACTH secretante a fost remarcată de asemenea și pentru cazul nostru. Mai mult, autorii au remarcat o creștere a indicelui de proliferare al celulelor tumorale în zona PRL secretantă comparativ cu cea ACTH pozitivă. Pentru pacienții cu boală Cushing prezența secreției duble de PRL și ACTH are drept bază histologică un adenom corticotrof secretant sau o hiperplazie nodulară cu celule secretante de ACTH asociat unui prolactinom „ silențios ” sau funcțional care determină hiperprolactinemie. Adenoamele hipofizare secretante de FSH și LH au fost de asemenea prezente în studiul nostru. Este bine cunoscut faptul că, acest tip de adenoame hipofizare este extrem de controversat, atât din punct de vedere al simptomatologiei clinice cât și al aspectelor microscopice și imunohistochimice. Majoritatea autorilor clasifică adenoamele hipofizare FSH-LH secretante ca fiind adenoame de tip non funcțional, bazate pe absența imunoreactivității la anticorpii corespondenți. Totuși, alți autori par să fie mai precauți și consideră aceste adenoame hipofizare ca fiind non imunoreactive datorită cantității reduse de antigen care poate fi detectat în celulele adenomatoase. Cazurile pe care le-am identificat în studiul nostru ca fiind FSH-LH secretante au fost în majoritate adenoame hipofizare cu celule cromofobe (cu o singură excepție), iar pattern-ul predominant a fost cel papilar. Intensitatea reacției a fost moderată sau mare, din acest motiv și noi considerăm că termenul de non imunoreactiv este mai corect decât cel de non funcțional.

O posibilă explicație a acestor discordanțe de clasificare a adenoamelor hipofizare de tip FSH-LH ca nule sau non imunoreactive este dată de un studiu al lui Horvath și Kovacs care au demonstrat prin microscopie electronică diferențe structurale în celulele adenoamelor gonadotrofe dependente de sexul pacientului [34]. Dacă în cazul celulelor provenite din adenoamele gonadotrofe masculine, organitele celulare erau slab dezvoltate și necaracteristice, similare cu cele din adenoamele hipofizare nule, în celulele adenoamelor hipofizare gonadotrofe feminine au fost evidențiate dilatații veziculare ale complexului Golgi, distincte, în „fagure de miere”, aspect care nu este caracteristic nici unui alt tip de celule din variatele forme de adenoame hipofizare [51]. Ulterior, și alți autori au confirmat aspectul dicotomic dependent de sex în ceea ce privește modificările structurale din adenoamele hipofizare de tip gonadotrof [26]. Totuși, aceste aspecte rămân încă foarte controversate [33] și incomplet elucidate [55,56]. Un aspect particular al studiului nostru este determinarea a două asocieri extrem de rar citate în literatură: ACTH-LH și TSH-FSH.

Adenoamele hipofizare în care un hormon gonadotrop a fost asociat cu ACTH par să aibă un profil molecular aparte [11] și un comportament clinic particular. Asocierea TSH-FSH a fost raportată în literatură în puține studii datorită rarității adenoamelor hipofizare TSH secretante care reprezintă sub 2% din totalul adenoamelor hipofizare [10]. Asocierea TSH-FSH este și mai rar menționată în literatură, [8,65] fiind descrisă ca o alianță între subunitatea β a TSH IR și subunitatea β a FSH. Datorită rarității acestei asocieri, nu există în prezent date care să caracterizeze evoluția clinică a pacienților care prezintă astfel de îmbinări. Adenoamele plurihormonale nu au prezentat particularități semnificativ diferite de cele raportate în literatură.

Caracterele citologice (acidofil, bazofil, cromofob și mixt) precum și pattern-ul de creștere (solid, papilar, trabecular, alveolar, fusiform) au fost corelate cu expresia fiecărui tip de hormon evaluat imunohistochimic. Cazurile au fost inițial grupate în funcție de tinctorialitatea celulelor adenomatoase, indiferent de pattern-ul de creștere a acestora. Corelațiile pe care le-am obținut au fost clasificate ca și corelații totale în cazul în care toți cei trei indici de corelație evaluați (Spearman, Kendal și Pearson) au avut valori statistice semnificative, sau corelații parțiale când am înregistrat un indice de coeziune pentru cel puțin unul din parametrii menționați. Conform programului automat SPSS version 17, de realizare a corelațiilor mai sus menționate, au fost analizați indici cu o valoare semnificativ statistică, coeficienții de corelație $p < 0.01$ pentru corelația de tip Pearson, și un $p < 0.05$ pentru indicii de corelație de tip Kendall și Spearman.

Adenoamele hipofizare acidofile, bazofile, cromofobe și mixte au fost evaluate în raport cu expresia imunohistochimică a hormonilor hipofizari. Adenoamele hipofizare de tip acidofil s-au asociat cu o expresie moderată și crescută a GH evaluate imunohistochimic ca fiind +2 și + 3. Pentru adenoamele hipofizare de tip acidofil, am obținut o corelație totală semnificativ statistică pentru toți indicii studiați. Indicele de corelație Pearson a avut o valoarea de $P = 0,002$, similară cu cea pentru indicele de corelație Kendall. Am observat o interdependență mult mai puternică între aspectul acidofil și secreția de STH pentru parametrul de corelație Spearman. Tabelele cu variabilele și corelațiile menționate sunt reprezentate în Figura 4.

		Tip acidofil	GH			Tip acidofil	GH	
a	Tip acidofil	Pearson Correlation	1.000	-0.400	Kendall's tau_b	Correlation Coefficient	1.000	-0.353
		Sig. (2-tailed)		.002		Sig. (2-tailed)		.002
	GH	N	60	60	GH	Correlation Coefficient	-0.353	1.000
		Sig. (2-tailed)		.002		Sig. (2-tailed)		.002
b	Tip acidofil	Pearson Correlation	1.000	-0.404	Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	-0.404
		Sig. (2-tailed)		.001		Sig. (2-tailed)		.001
	GH	N	60	60	GH	Correlation Coefficient	-0.404	1.000
		Sig. (2-tailed)		.001		Sig. (2-tailed)		.001

Fig.4. Evaluarea statistică a corelației Pearson (a), Kendall și Spearman (b) dintre tipul acidofil și expresia imunohistochimică a GH

Diagnosticul histopatologic convențional nu trebuie minimalizat în evaluarea adenoamelor hipofizare. Profilul morfologic al adenoamelor hipofizare din Republica Moldova a fost dominat de combinațiile de pattern-uri solid acidofil și papilar bazofil. Pattern-ul cromofob a fost mai des întâlnit la cazurile din Republica Moldova comparativ cu statisticile realizate în alte regiuni ale Europei sau în USA. Lipsa corelațiilor dintre profilul morfologic și indicele de proliferare sau expresia factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți a redus impactul morfologiei convenționale asupra factorilor de prognostic și terapie. Rata adenoamelor hipofizare pure în lotul studiat în Republica Moldova a fost mai mic decât cel întâlnit și raportat în România (34% versus 60%) [42]. Din punct de vedere al profilului hormonal imunohistochimic, lotul de studiu a fost extrem de eterogen. Majoritatea cazurilor cu profil hormonal rar nu au fost caracterizate până în prezent din punct de vedere clinicopatologic și, acest fapt reprezintă scopul continuării cercetărilor în domeniul patologiei hipofizare particularizat pentru Republica Moldova.

Factorii predictivi pentru diagnosticul și terapia adenoamelor hipofizare

Un alt capitol al tezei este dedicat factorilor predictivi pentru diagnosticul și terapia adenoamelor hipofizare.

Adenoamele hipofizare pot crește fie prin expansiune, fie prin invazia structurilor adiacente. În primul caz, tumorile sunt mici, bine delimitate și restricționate în șaua turcească. Adenoamele invazive au de obicei o creștere rapidă, invadând țesuturile vecine ca: sinusul sfenoid, sinusul cavernos și în unele cazuri chiar țesutul cerebral.

Mecanismul invaziv al acestor adenoame agresive nu este încă înțeles pe deplin. Proliferarea continuă de la adenom la adenom invaziv și carcinom nu a fost demonstrată în marea majoritate a tumorilor. Tendința de infiltrare locală a adenoamelor hipofizare și invazia țesuturilor adiacente pare a nu se corela cu aspectele histologice ale tumorii. Adenoamele invazive nu trebuie să prezinte neapărat aspecte histologice de agresivitate incluzând pleomorfismul, atipia nucleară și activitate mitotică. În pofida faptului că adenoamele funcționale și cele nefuncționale se pot prezenta ca tumori invazive, s-a observat că cele funcționale au această proprietate mult mai des.

Studierea activității proliferative a adenoamelor a fost utilizată pentru a discerne adenoamele agresive de cele indolente. Aceste studii au arătat că majoritatea tumorilor prezintă un indice de proliferare sub 3%. Adenoamele clinic funcționale prezintă o proliferare mult mai mare decât cele nefuncționale. Există o puternică corelație între expresia Ki-67 (MIB-1) și capacitatea de invazie a adenoamelor, însă nu s-a demonstrat încă o corelație între indexul proliferativ și recurența acestora. Tumorile care prezintă o activitate mitotică crescută și/sau un indice Ki-67 crescut trebuie să fie desemnate ca adenoame atipice, iar pacienții trebuie urmăriți cu atenție. Adenoamele pituitare sunt tumori cu o rată de creștere variabilă, și cu un potențial de invazie și recurență variabil. Unele tumori cresc rapid, altele rămân în stare dormantă mult timp. Rata de recurență este de asemenea greu de prezis, adenoame hipofizare care inițial erau cu rată de proliferare redusă, achiziționează un ritm de proliferare rapid, și produc recidive agresive. Capacitatea de predicție a potențialului proliferativ al adenoamelor hipofizare ar putea avea implicații majore în managementul clinic al adenoamelor hipofizare. Literatura de specialitate a fost axată pe identificarea factorilor predictivi

de comportament al adenoamelor hipofizare. Indexul de proliferare Ki67 a fost demonstrat ca fiind o unealtă utilă în măsurarea proliferării tisulare și, din acest motiv, a fost studiat extensiv.

În adenoamele hipofizare, indicele de proliferare pentru Ki67 a fost remarcat ca fiind crescut în cazurile cu recurențe. Nu sunt date precise despre implicarea hormonilor hipofizari în determinarea ratei de proliferare și a factorilor de creștere în adenoamele hipofizare. Din acest motiv, scopul studiului de față a fost de a identifica rolul potențial al hormonilor hipofizari precum și a factorilor de creștere, GFAP și proteinei S100 în influențarea ratei de proliferare a adenoamelor hipofizare. Adenoamele hipofizare proliferante au reprezentat un procent de 73% din totalul cazurilor incluse în studiu. Expresia Ki 67 a fost restricționată nuclear, intensitatea reacției fiind variabilă, în cele mai multe cazuri moderată și intensă. Rata de proliferare a fost extrem de heterogenă în cadrul grupului, variind între 4/1000 și 49/1000 (Figura 5 a, b).

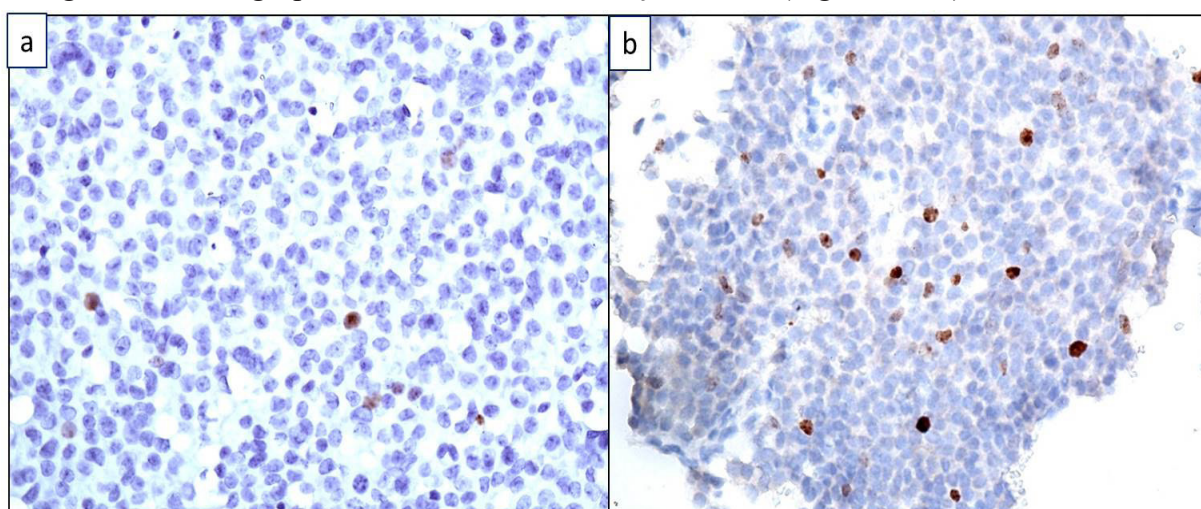


Fig.5. Variabilitatea ratei de proliferare a adenoamelor hipofizare. Adenoame hipofizare cu rată de proliferare scăzută (a) și rată de proliferare mare (b)

Cea mai înaltă rată de proliferare a fost înregistrată în adenoamele de tip acidofil sau în ariile cu celule acidofile din cadrul adenoamelor hipofizare mixte. Adenoamele hipofizare de tip cromofob au fost negative pentru Ki67 în proporție de 90%, la fel ca și cele care au prezentat celule bazofile [39].

Din totalul cazurilor incluse în studiu, 43,33% au fost pozitive la GFAP. În toate cazurile celulele tumorale au prezentat o expresie slabă sau moderată cu localizare strict citoplasmatică (Figura 6a). În schimb celulele FS au avut o reacție de intensitate similară celor din hipofiza normală dar, densitatea lor a fost net superioară celei din țesutul hipofizar normal (Figura 6b).

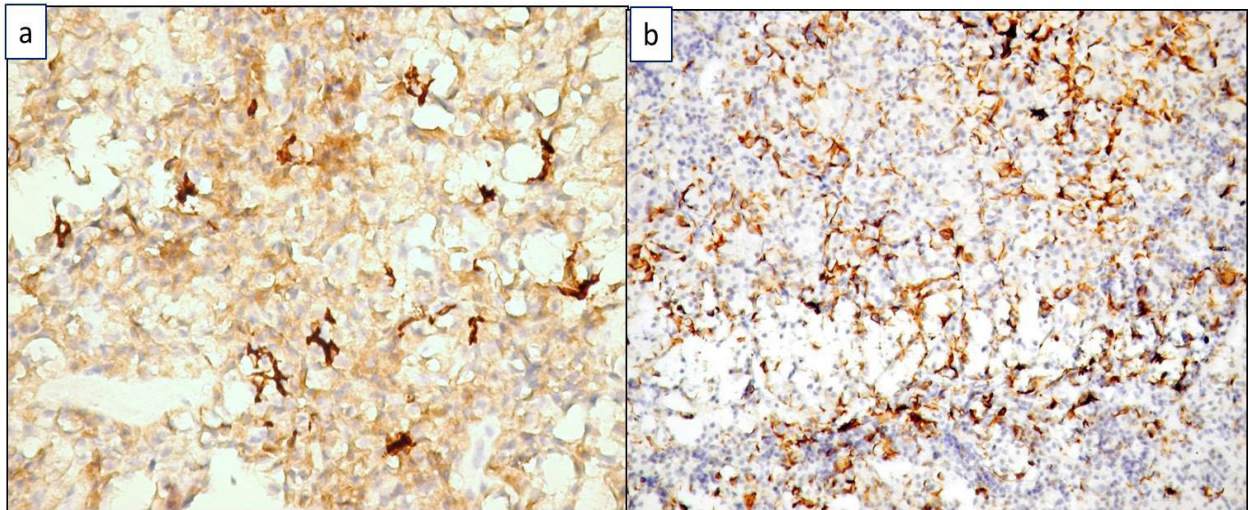


Fig.6. Celule tumorale GFAP pozitive cu intensitate redusă și moderată printre care se observă celule folicular stelate intens pozitive la GFAP (a) într-un adenom hipofizar GH secretant. Densitate crescută de celule FS, GFAP pozitive într-un adenom hipofizar secretant de LH(b)

Cea mai mare densitate de celule FS-GFAP+ a fost remarcată în adenoamele hipofizare plurihormonale, predominant în tipul papilar. Celulele FS-GFAP+ au format în acest caz o rețea foarte bine organizată prin interrelația pe care au realizat-o cu ajutorul prelungirilor citoplasmaticice (Figura 7a). În anumite zone, interacțiunea dintre celulele FS-GFAP+ și vasele capilare a fost întreruptă prin interpunerea de celule tumorale între cele două structuri histologice (Figura 7b).

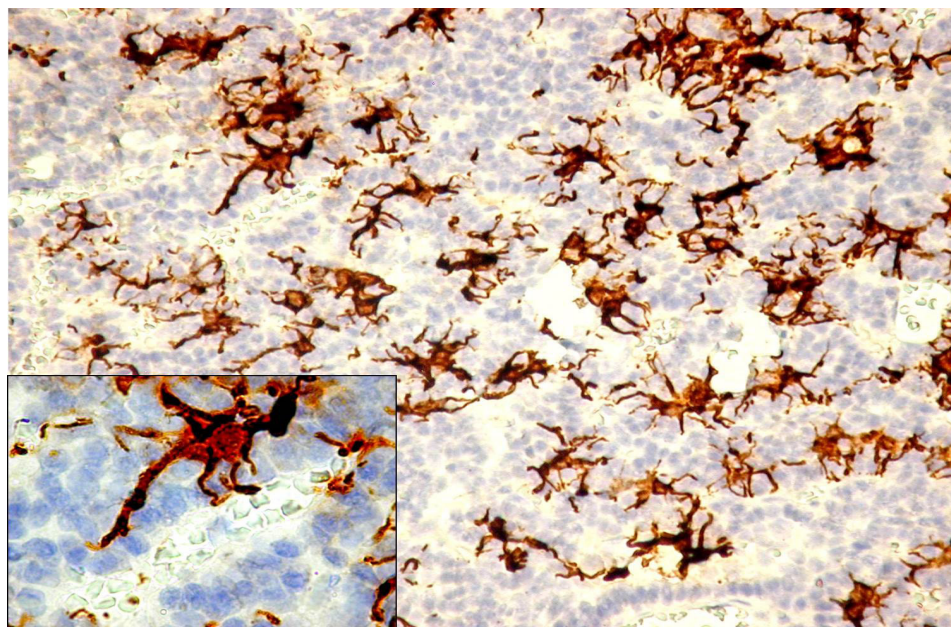


Fig.7. Distribuția celulelor FS-GFAP+ în adenoamele hipofizare plurihormonale. De remarcat densitatea crescută și dispoziția sub formă de rețea dată de interconexiunile dintre prelungirile numeroase ale celulelor FS-GFAP+. Interpunere de celule tumorale între prelungirile celulelor FS-GFAP+ și peretele vasului capilar ce sugerează disrupția barierei hematoencefalice

Proteina S100 în adenoamele hipofizare a fost studiată tot prin metoda imunohistochimică pe hipofiza normală și adenoamele hipofizare. Proteina S100 s-a demonstrat a avea un pattern nuclear și citoplasmatic, fiind pozitivă în celulele folicular stelate dar și în celulele endocrine ale hipofizei normale (Figura 8) și adenomatoase [37].

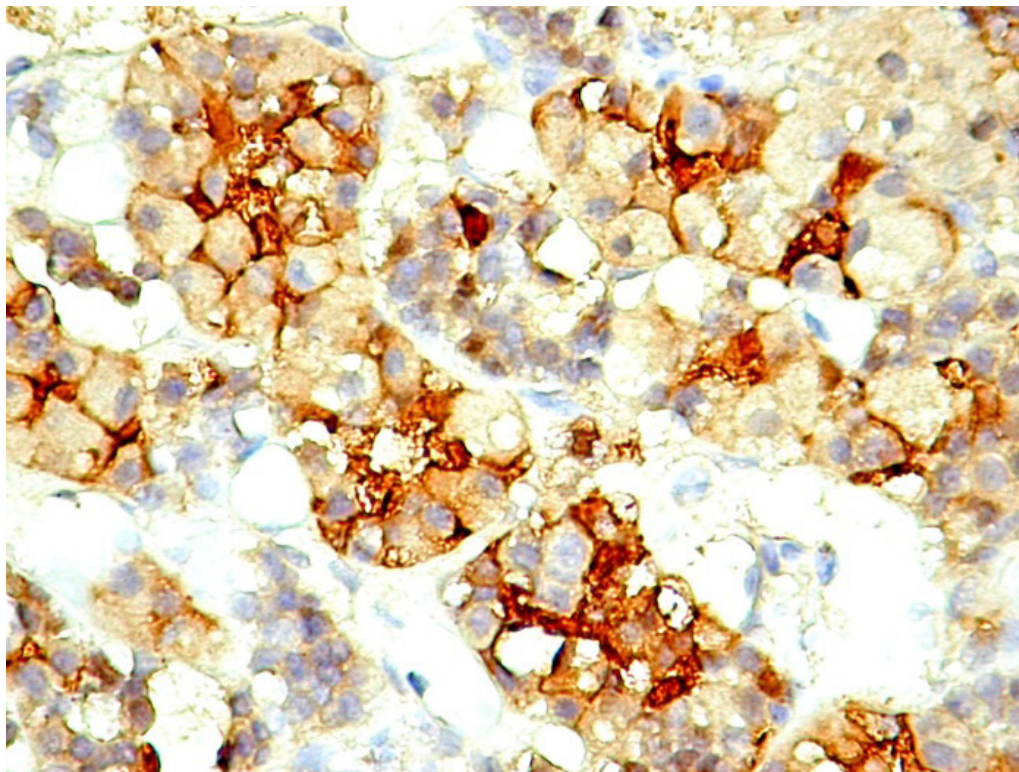


Fig.8. Expresia proteinei S100 în hipofiza normală. Se remarcă expresie intensă, nucleară și citoplasmatică în celulele folicular stelate și expresie moderată restricționată citoplasmatic în celulele endocrine cu pattern acidofil pe HE și intensitate slabă în celulele cromofobe

Ca particularități imunohistochimice ale expresiei proteinei S100, am observat variabilități în prezența, intensitatea și distribuția acestui marker în raport cu profilul hormonal. Adenoamele hipofizare GH secretante au fost extrem de heterogene în ceea ce privește expresia proteinei S100 în celulele tumorale. Cazurile au variat de la absența expresiei în celulele tumorale (celulele folicular stelate fiind pozitive, la expresie slabă, cu localizare strict citoplasmatică, la expresie intensă, în toată aria tumorală, nuclear și citoplasmatic sau doar citoplasmatic.

Aspectul particular pe care l-am remarcat la expresia GFAP în adenoamele ACTH secretante, s-a repetat și în cazul expresiei proteinei S100. Celulele tumorale au fost negative pentru proteina S100. În schimb, în jurul spațiilor vasculare, au fost distribuite celule S100 pozitive cu expresie nucleară și citoplasmatică, și cu o morfologie de celule folicular stelate

Raportat la profilul hormonal, nici unul dintre cei șase hormoni utilizați în realizarea profilului imunohistochimic nu s-a corelat semnificativ statistic cu expresia proteinei S 100.

În schimb, dintre factorii de creștere și receptorii corespondenți, proteina S100 s-a corelat semnificativ statistic cu expresia EGFR în cazurile pentru care proteina S100 a avut o expresie moderată sau intensă.

Expresia GFAP și a proteinei S100 a fost studiată în adenoamele hipofizare, fiind frecvent asociată cu celulele foliculostelate [16,30]. Expresia lor în celulele tumorale, cuantificată separat în variatele tipuri de adenoame hipofizare reprezintă un subiect sporadic în literatură și, din acest motiv, corelațiile cu prognosticul, supraviețuirea pe termen lung, recidivele și implicațiile terapeutice sunt extrem de neconvingătoare în prezent. Date din ce în ce mai numeroase sugerează capacitatea celulelor endocrine tumorale și non tumorale de a se transdiferenția în celule foliculostelate în care cei doi markeri se suprapun din punct de vedere al expresiei imunohistochimice, aceste celule FS fiind de fapt considerate ca celule stem pluripotente [25]. Fenomenul de „retrodiferențiere” a fost observat și descris în special în cazul adenoamelor hipofizare ACTH secretante. În studiul nostru am observat de asemenea un aspect particular de distribuție, localizare și expresie a GFAP și S100 pentru adenoamele hipofizare ACTH secretante. Celulele FS, GFAP+/S100+ au fost distribuite în jurul vaselor sanguine sau au delimitat spații pseudovasculare. Asocierea semnificativ statistică a GFAP cu VEGF nu a fost surprinzătoare, dat fiind faptul că VEGF a fost izolat inițial din celulele FS ale adenohipofizei bovine [23] și, mai mult decât atât adenoamele hipofizare au exprimat VEGF și în celulele tumorale.

Expresia GFAP și a proteinei S100 în celulele tumorale este implicată în patogeneza adenoamelor hipofizare GH și PRL secretante, mecanismele de activare fiind incomplet studiate în prezent. Acest aspect pare să reprezinte un factor de prognostic nefavorabil care guvernează fenomenul de retrodiferențiere și susține prezența celulelor stem pluripotente. Rezultatele noastre susțin prezența a două subtipuri moleculare de celule foliculostelate respectiv GFAP+/VEGF+/S100- și o alta GFAP-/S100+/EGFR+ concomitent cu varianta clasică GFAP+/S100+.

Implicarea factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți în patologia adenoamelor hipofizare

Implicarea factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți în patologia adenoamelor hipofizare este expus în capitolul 5. O importanță deosebită se acordă factorilor de creștere VEGF, VEGF165b, PDGF și a receptorilor corespondenți în adenoamele hipofizare.

Imunohistochimic, VEGF a fost pozitiv în 45% din cazurile incluse în studiu. Au fost observate două pattern-uri de expresie a VEGF: un pattern membranar (Figura 9a), cu intensitate ridicată și omogenă, pe toată circumferința celulelor tumorale pozitive și un pattern citoplasmatic, granular (Figura 9b). În unele cazuri, cele două pattern-uri au fost observate concomitent în celulele tumorale, fie combinate pentru aceiași celulă (Figura 9c), fie, în cazul adenoamelor hipofizare mixte, separate în diferitele celule tumorale care au intrat în componența acestora.

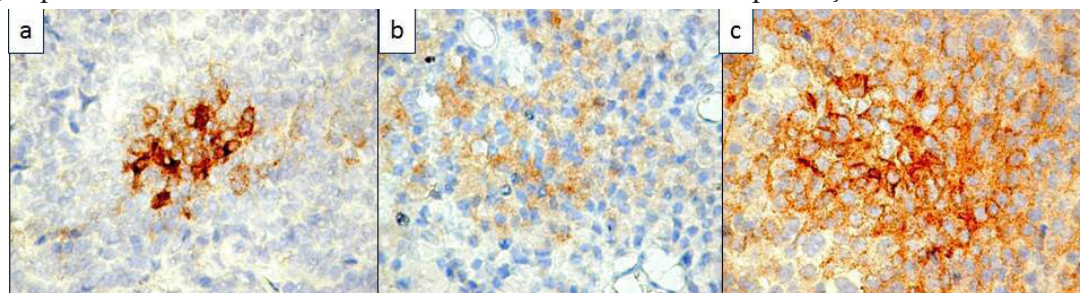


Fig.9. Pattern-ul de expresie al VEGF în adenoamele hipofizare: membranar (a), citoplasmatic difuz (b), membranar și citoplasmatic (c)

Expresia difuză a fost caracteristică adenoamelor hipofizare secretante de GH și PRL în timp ce aspectele focale și insulare au predominat în adenoamele secretante de TSH, ACTH și LH. Referitor la intensitatea expresiei imunohistochemice a VEGF, în adenoamele hipofizare GH pozitive, VEGF a avut o expresie mixtă citoplasmatică notată cu + 3, cu un pattern granular combinat cu o intensificare membranară. Adenoamele hipofizare cu profil hormonal mixt de tip GH-PRL s-au caracterizat printr-o expresie moderată notată cu +2 dar cu o densitate crescută a celulelor pozitive. Pentru profilul hormonal GH-TSH intensitatea expresiei VEGF a fost mare, notată cu +3.

Din totalul adenoamelor hipofizare VEGF pozitive, 77,4% au prezentat o intensitate moderată și mare, fiind notate cu +2 și +3. Pentru confirmarea imunohistochemiei, aceste cazuri au fost selectate pentru metoda de detecție a RNA bazată pe *hibridizarea in situ* aplicată pe secțiunile de parafină. Un procent de 88, 24% dintre cazurile evaluate prin hibridizare *in situ* au fost pozitive la VEGF. Intensitatea semnalului de amplificare a fost evaluat în funcție de numărul semnalelor pozitive cu distribuție nucleară. Astfel, am observat o eterogenitate a amplificării genice a VEGF în adenoamele hipofizare, variind de la +1 la +4 (Figura 10 a-d), 53,33% fiind evaluate cu un scor de 3 și 4.

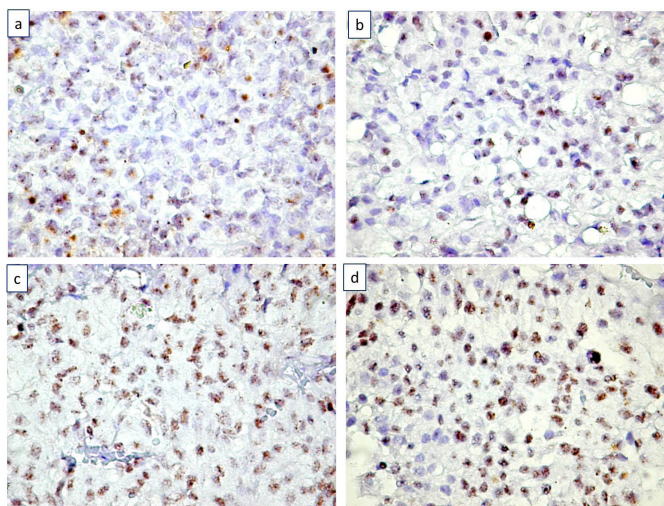


Fig.10. Scorul de interpretare al VEGF mRNA în adenoamele hipofizare. Amplificare genică notată cu +1 (a), +2 (b), +3 (c) și +4 (d). De remarcat pattern-ul de amplificare de la amplificare punctiformă cu semnale distincte (a) la clustere și grupuri de semnale intens pozitive pentru proba VEGF mRNA(d)

Expresia crescută a VEGF în majoritatea adenoamelor hipofizare corelată cu densitatea vasculară scăzută, cuantificată în studiile anterioare pe hipofiză, ne-a obligat să identificăm dacă, varianta inhibitorie a VEGF, respectiv VEGF165b este de asemenea supraexprimată în adenoamele hipofizare, ca o posibilă explicație a MVD scăzute. Din acest motiv, s-a realizat, prin metoda imunohistochemică, cuantificarea VEGF165b. Interpretarea reacției imunohistochemice s-a realizat similar cu cea a VEGF [43].

Un procent de 16,66% din cazurile studiate au avut reacție pozitivă la VEGF165b. În majoritatea cazurilor, reacția a fost de intensitate slabă, notată cu +1 și, în 7 cazuri am înregistrat reactive moderată cu intensitate +2. Pattern-ul de expresie a fost citoplasmatic, granular (predominant) și în rare cazuri membranar, combinat cu cel citoplasmatic. Raportat la tipul histopatologic, toate cazurile VEGF165b pozitive au fost de tip acidofil sau au inclus arii de celulele acidofile, în cazul adenoamelor hipofizare mixte [40].

PDGF A și axul PDGF B/PDGFR β , fiind bine cunoscuți ca factori mitogeni pentru celulele normale în dezvoltarea sistemului nervos cât și în cadrul proceselor tumorale maligne, PDGF A și B împreună cu receptorii corespondenți nu au încă un impact foarte bine descris în patogeneza adenoamelor hipofizare. Date disparate din literatură, grupate în mai puțin de 10 articole de cercetare referitoare la această temă, sugerează implicarea PDGFs și PDGFRbeta în modificările secreției hormonilor hipofizari, dar o corelație între profilul hormonal și expresia acestora nu este încă bine definită.

Expresia PDGF A a fost observată în 66,66% din cazurile de adenoame hipofizare incluse în studiu. Expresia imunohistochimică a fost citoplasmatică și membranară și, doar în cazuri izolate s-a remarcat prezența reacției pozitive cu localizare nucleară, scorul de interpretare fiind predominant de +2 și +3 (Figura 11 a, b, c, d). Adenoamele hipofizare papilare au constituit 34,14% din cazurile pozitive la PDGF A, fiind urmate de cele de tip compact (19,5%), mixte (17%), de tip fusiform (21,95%) și alveolar (7,4%).

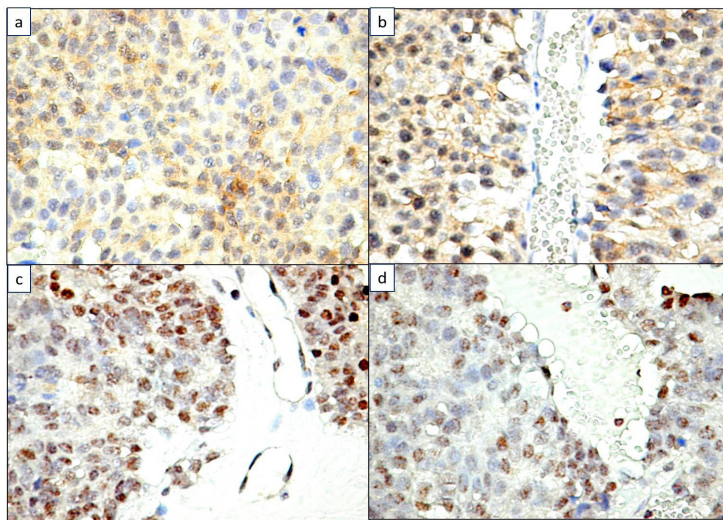


Fig.11. Expresia PDGF A în adenoamele hipofizare. Citoplasma celulelor tumorale a fost pozitivă pentru PDGF A (a). Pattern membranar observat predominant în celulele tumorale din jurul vaselor sanguine (b). Expresia nucleară s-a observat în celulele endoteliale și celulele tumorale (c). În cazuri izolate, celulele tumorale cu semnal pozitiv în nucleu au delimitat spații vasculare (d)

În cazul adenoamelor hipofizare, factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF) a fost cel mai intens studiat fiind un factor controversat din punct de vedere al implicării sale în procesul de angiogeneză tumorală în tumorile hipofizare.

Este certificat faptul că celulele tumorale din adenoamele hipofizare secretă VEGF în cantități variabile, supraexpresia sa fiind asociată extensivă supraselară și fiind considerată ca factor de prognostic nefavorabil [52, 60].

Expresia VEGF a fost heterogenă în grupul de adenoame hipofizare studiate în prezenta cercetare. Cele trei tipuri de expresie au fost difuz, focal și insular. Aspectul difuz a coincis cu adenoamele hipofizare GH și PRL secretante la care am obținut corelație semnificativ statistică între profilul hormonal și supraexpresia VEGF. Majoritatea datelor din literatură au prezentat rezultate similare cu cele găsite de noi.

Astfel, pe baza rezultatelor noastre putem considera, că supraexpresia VEGF a caracterizat pattern-urile de creștere papilar și solid. Aparent caracterizate prin aceeași intensitate de expresie imunohistochimică, aplicarea metodei de detectare a VEGF mRNA a evidențiat diferențe de expresie genică prin prezența semnalelor distincte nucleare în pattern-ul solid versus clustere de amplificare în celulele tumorale din adenoamele hipofizare de tip papilar. Mai mult, aplicarea tehnicilor de *hibridizare in situ* pentru identificarea VEGF mRNA în adenoamele hipofizare este o metodă sensibilă, detectând nu doar amplificarea genică la nivelul celulelor tumorale, dar și în celulele endoteliale care participă la fenomenul de angiogeneză prin intususcepție observat în studiul nostru.

Mai mult de jumătate din numărul total de cazuri (64%) au prezentat o reacție moderată și intensă, notată cu +2 respectiv +3 pentru EG VEGF. La acest procent, s-au mai adăugat 15% din cazuri, notate cu +1 în care am observat celule sau grupuri mici de celule pozitive la EG VEGF, motiv pentru care, acestea au fost incluse în lotul de cazuri negative, astfel că, le-am considerat ca fiind negative un procent de 36% din cazuri.

Hipofiza normală a prezentat o reacție pozitivă pentru EG VEGF (Figura 1a), cu pattern granular citoplasmatic și cu expresie heterogenă nu doar de la o celulă la alta dar și în cadrul aceluiasi tip celular. Astfel, expresia EG VEGF a fost observată în celulele acidofile și cromofobe și a fost absentă în celulele bazofile.

EG VEGF cunoscut și sub denumirea de Prokineticin1 este certificat ca un puternic mitogen al celulelor endoteliale precum și ca un factor implicat în tumorigeneza diferitor organe cu rol endocrin cum ar fi pancreasul, ovarul sau glanda pituitară. Prezentul studiu a demonstrat expresia diferențiată a EG VEGF în hipofiza normală, astfel că celulele acidofile și cromofobe au fost intens pozitive pentru EG VEGF în timp ce în celulele bazofile EG VEGF a fost negativ. Acțiunea EG VEGF asupra celulelor endoteliale cu rol major în formarea fenestrațiilor specifice este unanim acceptată astăzi însă rolul său în dezvoltarea și progresia adenoamelor hipofizare este incomplet elucidat.

Rolul Proteinelor HER2 și EGFR ca potențiali factori de prognostic și terapie pentru adenoamele hipofizare induce stabilirea unei terapii țintite reprezintă aspecte importante ale evaluării diagnostice în tumorile benigne și maligne. Tendința actuală de a aplica terapia personalizată pentru fiecare pacient în parte dependent de profilul molecular al tumorii stimulează cercetarea, descrierea și utilizarea unor noi ținte terapeutice cu înaltă sensibilitate și specificitate pentru care se dezvoltă ulterior terapii țintite.

Specimenul de hipofiză normală a fost negativ la imunocolorarea cu anticorpi anti HER2. Mai mult de o treime din totalul cazurilor de adenoame hipofizare (33,33%) au prezentat reacție imunohistochimică pozitivă la HER 2. Reacția a avut un pattern membranar și citoplasmatic (Figura 12 a, b), cu predominanța celui membranar. Restricționarea membranară a expresiei HER2 s-a remarcat la celulele bazofile din cadrul adenoamelor hipofizare cu celule bazofile sau din cadrul celor mixte. Pentru celulele acidofile din componența adenoamelor hipofizare expresia imunohistochimică a HER2 a fost predominant citoplasmatică, având un pattern granular (Figura 12 b).

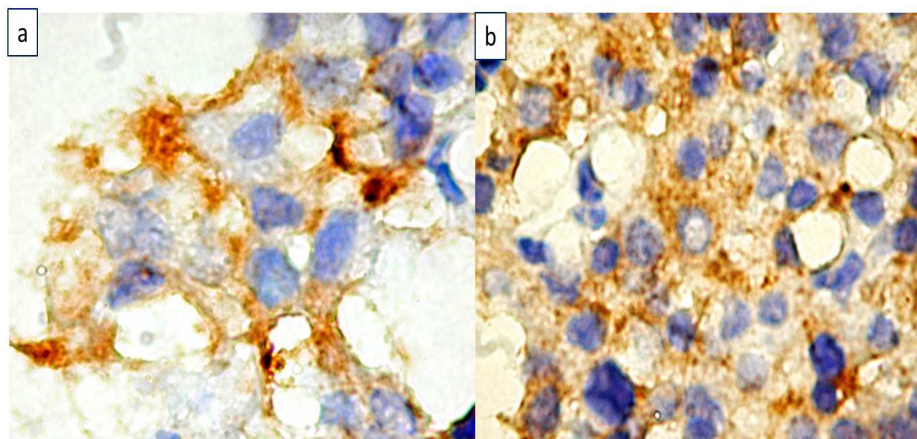


Fig.12. Expresia imunohistochimică a proteinei HER2 în adenoamele hipofizare, cu cele două pattern-uri de expresie: membranar (a) și granular citoplasmatic (b)

Studiul expresiei HER2 în adenoamele hipofizare a continuat cu evaluarea corelației dintre hormonii hipofizari, pentru a vedea dacă, în cazul adenoamelor hipofizare HER2 pozitive, asocierile hormonale diferă față de cele obținute în cazul tuturor adenoamelor hipofizare. Astfel, în adenoamele hipofizare HER2 pozitive, s-a înregistrat co-expresia GH-PRL care a avut o valoare semnificativ statistică ($p=0.005$). De asemenea o corelație parțială de tip Kendall ($p= 0.036$) și Spearman ($p=0.032$) s-a înregistrat pentru co-expresia PRL-LH.

Pentru TSH –FSH și TSH –LH în cazurile HER2 pozitive corelația de co-expresie a fost semnificativ statistică pentru ambii hormoni, având un $p=0.028$, și respectiv $p=0.024$. O altă co-expresie semnificativ statistică s-a înregistrat între FSH-LH ($p=0.000$) pentru adenoamele HER2 pozitive. Expresia HER2 nu s-a corelat cu expresia EGFR și nici cu cea a factorului de creștere al endoteliului vascular, ambele studiate în această temă.

Jumătatea din cazurile de adenoame hipofizare pozitive pentru HER2 (50%) au primit un scor de +2 la interpretarea microscopică a reacției imunohistochimice, 45% au fost catalogate ca având un scor de +1 și doar 5% au prezentat expresie intensă a HER2 notată cu +3. Din aceste motive, pentru a respecta protocolul de evaluare a HER2 aplicat în tumorile mamare, toate cazurile +2 pozitive au fost reevaluate pentru detectarea amplificării genice prin metoda de hibridizare in situ cu chromogen (CISH).

Analiza expresiei EGFR în adenoamele hipofizare a relevat faptul că, un procent de 48.33% din cazuri au fost pozitive pentru acest marker. S-a înregistrat o heterogenitate de expresie a EGFR

în adenoamele hipofizare studiate, raportată la pattern-ul de expresie precum și la intensitatea expresiei imunohistochimice.

Proteinele HER1 și HER2 sunt recunoscute ca fiind ținte terapeutice importante în numeroase patologii maligne precum cancerul mamar [15,29], cancerul pulmonar [12,24] sau cel gastric [47].

Spre deosebire de celelalte studii privind expresia proteinei HER2 în adenoamele hipofizare, prezentul studiu a remarcat supraexpresia sa în adenoamele hipofizare cu celule cromofobe, aspect care nu a mai fost menționat anterior. Independent de tipul solid sau papilar, HER2 a fost pozitiv în aproximativ 66% din cazurile cu celule acidofile. În adenoamele hipofizare pure, supraexpresia HER2 s-a corelat cu secreția de PRL dar nu și cu cea a GH. Această corelație susține și mai mult implicarea heterodimerizării HER2 cu HER3 în adenoamele hipofizare PRL secretante, aspect bazat și pe faptul că, există date publicate anterior care au demonstrat rolul prognostic nefavorabil al asocierii HER2/HER3 ca factor de agresivitate crescută în adenoamele hipofizare PRL secretante și au sugerat că inhibarea țintită a acestei supraexpresii ar putea fi o alternativă terapeutică utilă în cazul prolactinoamelor cu evoluție nefavorabilă, rezistente la terapia convențională [66].

Un alt aspect particular obținut în cadrul cercetării de față este reprezentat de asocierea PRL-ACTH-EGFR, care s-au corelat complet, semnificativ statistic. Heterogenitatea expresiei factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți este dependentă de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Adenoamele hipofizare GH și PRL secretante sunt cele mai active din punct de vedere al sintezei și eliberării factorilor de creștere. VEGF este cel mai intens exprimat din punct de vedere proteic și genic și reprezintă candidatul cu cele mai mari șanse de succes în ceea ce privește aplicarea terapiei țintite. Datorită expresiei sale în celulele tumorale și celulele folicular stelate, aplicarea terapiei anti VEGF ar putea avea o țintă dublă. Expresia VEGF și PDGF se suprapune în adenoamele hipofizare ceea ce sugerează efectul sinergic al potențialului mitogen pe de o parte și, pe de altă parte potențarea reciprocă a sintezei și acțiunii autocrine sau paracrine.

Rolul celulelor foliculostelate în patogeneza adenoamelor hipofizare este incomplete caracterizată. Rezultatele noastre, obținute prin corelarea expresie EG VEGF cu proteina S100 și a GFAP sugerează o reactivitate a celulelor folicular stelate în patogeneza adenoamelor hipofizare. Momentan este greu de spus dacă această corelație se datorează activării celulelor folicular stelate sau expresiei proteinei S100 și a GFAP și în celulele tumorale.

Prezentul studiu a evaluat pentru prima dată în mod diferențiat expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare și a realizat corelații cu alți factori de creștere precum VEGF, EGFR sau PDGF A și B, factori deja certificați ca având un rol major în invazia și metastazarea tumorală. Datele obținute sugerează încă o dată existența în cadrul aceluiași forme histopatologice a unor forme moleculare distincte de adenoame hipofizare care, cel mai probabil au un comportament diferit și un prognostic variabil, dependent de profilul molecular care-l caracterizează. Proteina HER 2 și EGFR au un pattern de expresie specific dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Rezultatele noastre sugerează utilizarea supraexpresiei HER2 ca posibilă țintă terapeutică în adenoamele hipofizare doar după realizarea unui protocol complet imunohistochimic și ISH care să evalueze cazurile selectate de adenoame hipofizare

Date epidemiologice ale profilului hormonal ale adenoamelor hipofizare din Republica Moldova studiate comparativ cu profilul adenoamelor hipofizare din România

Gama largă a ratelor de incidență în cadrul studiilor individuale sugerează că există numeroși factori de risc responsabili de dezvoltarea acestora, sau că tumorile sunt operabile la diferite etape de monitoring. Este bine stabilit faptul că adenoamele hipofizare apar din expansiunea clonală a celulelor somatice mutante, dar mecanismul causal implicat în tumorigeneză rămâne a fi stabilit. Unele gene specifice par să predisună la formarea tumorii hipofizare, în timp ce oncogenele nu joacă un rol în formarea tumorilor hipofizare. Am folosit o resursă cuprinzătoare, bazată pe populație, pentru a examina diferențele demografice ale ratelor de incidență pentru adenoamele hipofizare. Din câte cunoaștem, aceasta este prima dată când baza de date a fost utilizată pentru a examina demografia adenoamelor hipofizare în Republica Moldova și România.

Ținând cont de dimensiunile mici ale tumorilor hipofizare și a propensității acestora să existe asimptomatic sau să se manifeste prin simptome non-specifiche insidioase a devenit o provocare măsurarea cu precizie și prevalența adenoamele pituitare în populația generală. Analiza histologică a specimenelor de autopsie și radiologie (tomografie computerizată (CT) și imagistica prin rezonanță magnetică (RMN) de la pacienții aflați în tratament sau au fost studiate pentru afecțiuni legate și nelegate de boala hipofizară sunt sursele principale care au fost utilizate pentru estimarea prevalenței populației ce suferă de adenoame hipofizare.

Scopul principal al acestui studiu a fost de a estima rata de incidență și prevalența adenoamelor hipofizare relevante din punct de vedere clinic la o populație bine definită, care locuiesc în zona urbană și suburbană a RM și României. Am definit adenoamele hipofizare relevante clinic ca fiind cele asociate disfuncției endocrine și / sau efectului de masă.

Datele epidemiologice privind adenoamele hipofizare ar putea ajuta la o alocare mai bună a resurselor umane pentru îngrijirea unor astfel de pacienți și de asemenea ar crește acuratețea diagnosticului pentru unele regiuni geografice în care identificarea unor astfel de afecțiuni este neglijată. Datele epidemiologice se referă la prevalența tumorilor pituitare și sunt de obicei raportate în țările dezvoltate. Prevalența tumorilor pituitare variază între 19 și 28 cazuri per 100000 în UK, până la 94 de cazuri per 100000 în Belgia și are o incidență cuprinsă între 0,4 și 8,2 per 100000 pe an [13,14]. Articolele publicate recent, privind epidemiologia descriptivă a adenoamelor hipofizare din USA au stratificat incidența tumorilor hipofizare în funcție de vârstă, sex, rasă sau subregiunile de unde au provenit pacienții. Diferențe semnificative au fost raportate privind incidența adenoamelor hipofizare între diferite grupuri rasiale în USA [22]. Datele epidemiologice despre adenoamele hipofizare din Europa sunt foarte rare, chiar pentru țările cu un sistem de sănătate foarte bine dezvoltat ca Austria și Elveția, unde registrele naționale de tumori cerebrale (care includ și adenoamele hipofizare) sunt relativ noi [67]. Pentru țările mici, în special cele din Europa centrală și de est, astfel de date statistice sunt destul de recente, cum ar fi pentru România [3] sau total absente cum este cazul cu RM. Datele statistice și epidemiologice privind diferențele profilului hormonal între grupurile populaționale sunt de asemenea reduse fiind raportate în special pentru prolactinoame, [7,48,63] celelalte tipuri de adenoame hipofizare fiind puțin studiate.

Studiile menționate mai sus au acoperit o arie geografică foarte bine delimitată care a inclus o țară sau o regiune a unei țări. Nu există în acest moment un studiu comparativ al profilului hormonal din adenoamele hipofizare între grupele de pacienți între Moldova și România. Din acest motiv prezentul studiu este axat pe identificarea similitudinilor și diferențelor epidemiologice specifice bazate pe profilul hormonal al adenoamelor hipofizare provenite din România și RM.

Pentru a obține cea mai bună estimare posibilă a veridicității prevalenței adenoamelor hipofizare la populația generală, am efectuat o revizuire sistematică a articolelor publicate, studii imagistice și metode histologice. Pentru a depăși variația între studii, am folosit efecte aleatorii pentru a estima prevalența populației utilizând un algoritm de ponderare inversă în care greutatea sunt estimate din variația studiului.

Materialul biopsic a fost recoltat prin intervenție chirurgicală deschisă sau abord transfenoidal. Fiecare caz a fost diagnosticat pe baza datelor clinice, biologice și imagistice. Biopsiile au fost fixate în formalină tamponată 10% pentru 48 ore și apoi incluse la parafină conform protocolului standardizat. Secțiuni seriate de 3 micrometri au fost obținute din fiecare bloc de parafină. Evaluarea histopatologică s-a realizat pe lamele colorate hematoxilină/eozină. Pe baza evaluării morfologice au fost selectate câte 6 secțiuni adiționale pe care s-a realizat profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Prin intermediul metodei imunohistochemice s-a realizat studiul celor 6 tipuri de hormoni (GH, PRL, ACTH, TSH, FSH, LH). Detalii despre anticorpii utilizați și despre procedura imunohistochemică se regăsesc în tabelul 1. Întreaga procedură imunohistochemică s-a realizat în sistem automat, folosind sistemul de imunohistochemie Bond (Leica Microsystems). Evaluarea microscopică a fost efectuată de trei observatori independenți utilizând microscopul Nikon Eclipse E600 (Nikon Corporation Japan). Imaginile au fost capturate și procesate folosind sistemul Lucia G. Prezența unui procent de peste 10% la sută de celule pozitive a fost considerată ca tumoare secretorie.

Rezultatele imunohistochemice pentru fiecare caz au fost gradate ca 0, 1, 2 și 3. Tumorile cu o expresie crescută GH, PRL au fost considerate mammosomatotrofe. Analiza statistică s-a realizat folosind sistemul SPSS versiunea 17. Metodele statistice au inclus teste de corelație ca: Pearson, Kendall și Spearman. Corelațiile au fost considerate semnificativ statistice dacă au avut o valoare a lui p mai mic de 0,05. O corelație a fost considerată totală, atunci când toate cele trei tipuri de teste au prezentat valori semnificative; și parțială, dacă două din cele trei teste de corelație au prezentat semnificație statistică.

Rezultate. Evaluarea globală a acelor două grupuri a demonstrat prezența necorespondenței privind profilul hormonal al adenoamelor hipofizare din România și Republica Moldova (Figura 13 a,b).

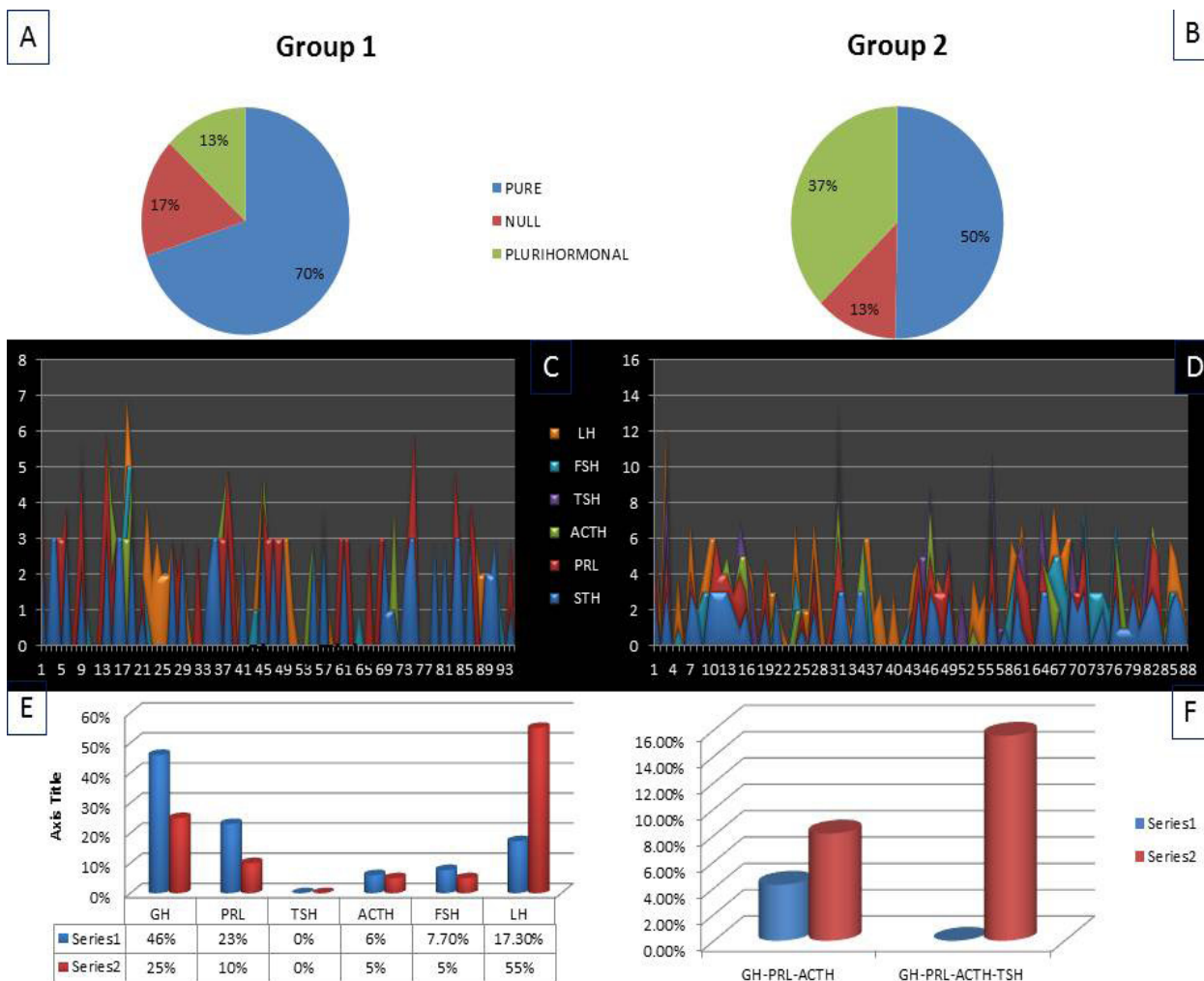


Fig.13. Variabilitatea geografică a adenoamelor hipofizare Pentru grupurile B(România) și C (Republica Moldova)

Pentru grupul „B” 70% din cazuri au fost adenoame hipofizare pure, 13% plurihormonale, în timp ce 17% au fost negative pentru toate cele șase tipuri de hormoni. Comparativ cu grupul „B” în grupul „C” sau înregistrat mai multe diferențe privind distribuția procentuală a cazurilor pe grupele uni-hormonale, plurihormonale și nule. Cazurile de adenoame hipofizare pure au reprezentat 55,3% din numărul total de cazuri, iar cele nule 12,5%. Cea mai mare diferență între cele două grupuri s-a înregistrat pentru adenoamele hipofizare plurihormonale, în grupul „C” aceasta fiind de 37,2% (respectiv de 2,86 de ori mai mare în grupul „C” comparativ cu grupul „B”). Evaluarea specifică bazată pe fiecare tip de hormoni a demonstrat o incidență crescută a adenoamelor hipofizare GH secretante în grupul „B”, comparativ cu grupul „C”. Din cele 94 cazuri ale grupului „B” 46,15% au fost adenoame GH secretante comparativ cu grupul „C” unde am obținut doar 25% adenoame GH secretante. Pentru prolactină (PRL) procentul de adenoame hipofizare pozitive a fost de 23% în grupul „B” și 10% pentru grupul „C”. Nici în unul din cele două grupuri incluse în studiu nu am întâlnit adenoame hipofizare pure secretante de TSH. În ceea ce privește adenoamele hipofizare ACTH secretante procentul de cazuri pozitive a fost relativ egal între cele două grupuri

(6% pentru grupul „B” comparativ cu 5% pentru grupul „C”). Cea mai mare concordanță privind tipul hormonal al adenoamelor hipofizare în cele două grupuri s-a înregistrat pentru FSH care a avut o valoare similară pentru cele două grupuri (7,7% pentru grupul „B” versus 5% pentru grupul „C”). În contrast cu cele de mai sus cea mai mare diferență între procentele de cazuri pozitive la un singur hormon s-a înregistrat pentru LH. Dacă pentru grupul „B” procentul de cazuri LH pozitive a fost de 17%, pentru grupul „C” acest procent a fost de 3,25 ori mai mare, respectiv o valoare procentuală de 55% din numărul total de cazuri.

Adenoamele plurihormonale au fost împărțite în două subgrupe, care au fost evaluate separat. Cea mai frecventă asociere cunoscută între GH și PRL a fost prezentă în 10,36% din cazurile grupului „B” și în 13,63% din cazurile grupului „C”. Triplele asocieri au fost prezente în ambele grupuri dar cu diferențe privind numărul și tipul hormonal. Dacă grupul „B” a prezentat tripla asociere în 4,25% din cazuri, pentru grupul „C” această asociere a fost întâlnită în 8,13% din numărul total de cazuri. Pentru ambele grupuri asocierea GH, PRL, ACTH a fost predominantă. O particularitate a grupului „C” comparativ cu grupul „B” a reprezentat-o existența asocierilor particulare hormonale întâlnite foarte rar în literatură. Chiar dacă au fost prezente într-un număr mic de cazuri (15,56%), acestea au inclus patru tipuri hormonale: GH, PRL, TSH, ACTH. Comparativ cu tripla asociere al patrulea hormon alăturat a fost TSH prezent în toate cazurile de cvadruplă asociere.

Date despre heterogenitatea geografică a tumorilor hipofizare au fost publicate anterior în relație cu variabilitatea genetică observate în special pentru adenoamele hipofizare familiale [4]. Studii populaționale privind epidemiologia adenoamelor hipofizare sunt puțin prezente în literatură, acest număr mic fiind datorat dificultăților de derulare a unor astfel de studii, care necesită o selecție foarte atentă a pacienților și o mare acuratețe a criteriilor de includere. Studiul nostru a evidențiat diferențe între grupurile „B” și „C” privind tipurile de adenoame hipofizare iar valorile obținute în au fost diferite comparativ cu cele raportate de Clayton. Într-un alt studiu realizat în Provincia Liege, Belgia, [13] adenoamele GH secretante au fost prezente în 13,2% din cazuri, aceasta deținând cea mai mică valoare prezentă în literatură.

În ceea ce privește adenoamele secretante de PRL ambele grupuri studiate au avut un număr mai mic de cazuri pozitive comparativ cu alte studii populaționale similare [1,13,9]. Dacă Ezzat și colaboratorii au demonstrat o variabilitate a procentului de cazuri PRL pozitive cuprinse între 25 și 41% din cazuri [18] studiul nostru a evidențiat o variabilitate cuprinsă între 10 și 25%. Grupul „C” a fost caracterizat de cea mai mică valoare a adenoamelor PRL secretante raportat în literatură comparativ cu datele deja existente [63]. Aceasta poate fi considerată o particularitate a adenoamelor hipofizare din regiunea geografică a R. Moldova. Chiar și pentru grupul „B” numărul de prolactinoame a fost mai mic decât cel din literatură. Fiind primul studiu comparativ derulat în Europa de sud-est și est vor mai fi necesare și alte investigații pentru elucidarea factorilor etiologici care determină aceste particularități. Ciccarelli și colaboratorii au raportat variabilitatea adenoamelor hipofizare în dependență de vârstă și sex, dar nu și de regiunea geografică [7]. Date izolate privind procentajul variabilității geografice a prolactinoamelor au fost raportate recent de

Pereira-Lima și colegii, care au relatat prezența prolactinoamelor în relație cu variabilitatea greutateii corporale în diferite regiuni ale Braziliei [45]. Studiile epidemiologice efectuate demonstrează că adenoamele ACTH secretante sunt cele mai puține la număr [18]. Majoritatea cercetărilor au elaborat date statistice cu privire la variabilitatea răspunsului clinic, etiologic și terapeutic, [32,64] fiind mai puțin axate pe distribuția geografică și diferențele regionale.

În studiul populațional, Clayton și colab., a raportat aproximativ 10% din adenoame hipofizare sunt ACTH secretante, comparativ cu studiul similar a lui Daly pentru regiunea Liege, unde, procentul de adenoame ACTH secretoare a fost raportat ca fiind de aproximativ 6% din cazuri. Procentajul de adenoame ACTH secretante în ambele grupuri ale noastre a variat între 5 și 6%, care corespunde cu rezultatele studiului lui Daly, dar diferă de rezultatele lui Clayton.

Majoritatea adenoamelor hipofizare non-funcționale sunt producătoare de gonadotrofină, care reprezintă 30%-35% din tumorile pituitare. Există puține date cu privire procentajul adenoamelor hipofizare LH pozitive din cauza evaluării acestora împreună cu adenoamele FSH secretante. În lotul C adenoame LH secretoare, au o frecvență de trei ori mai mare comparativ cu lotul B. Conform datelor noastre, procentul de adenoame LH secretoare, reprezintă cea mai mare valoare raportată până în prezent în literatura de specialitate, fiind constatat în 55% din cazuri în lotul C. Procentul de adenoame hipofizare non-secretante, în studiul nostru, a variat între 12,5% pentru lotul C și 17% pentru lotul B. Aceste valori au coincis cu cele din studiul lui Dayl, dar au fost mai joase în comparație cu rezultatele raportate de Clayton în studiul menționat deja.

Adenoamele plurihormonale raportate în literatura de specialitate manifestă pozitivitate pentru cel puțin trei markeri evaluați în studiul, conținând de obicei, celulele TSH pozitive [61], dar adenoame hipofizare exclusiv TSH secretante au fost rareori identificate și publicate în literatura de specialitate ca fiind cazuri senzaționale [19]. Yamada et al, spre deosebire de aceștia, au raportat recent creșterea numărului adenoamelor TSH secretante în perioada ultimilor cinci ani, dar acest studiu a fost efectuat doar într-un singur centru în baza a 90 de cazuri [68].

Majoritatea asocierilor plurihormonale identificate în actualul studiu au fost caracterizate prin prezența GH-PRL-ACTH, în comparație cu datele din literatură care au raportat periodicitatea TSH în aceste asocieri. Deși, TSH a fost prezent ca un al patrulea hormon în aproximativ 15,56% din asocierile cvadruple a fost constatat în mod exclusiv doar în grupul C, în prezentul studiu.

Prezenta lucrare pune în evidență dovezi impunătoare ale unui imunoprofil excepțional și specific al adenoamelor hipofizare, care își au originea în două regiuni diferite ale Europei de Est. Asocieri triple sau cvadruple identificate excepțional în lotul din Republica Moldova, ca fiind de o frecvență mai mare au completat profilul adenoamelor hipofizare. Diferențele menționate în lucrarea prezentă, generează întrebări cu privire la prezența unor factori etiologici sau epidemiologici regionali care pot să influențeze imunoprofilul adenoamelor hipofizare.

CONCLUZII GENERALE

1. Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare în Republica Moldova se caracterizează printr-un număr scăzut de prolactinoame și o incidență înaltă de adenoame LH secretante, ceea ce diferă de România și alte zone geografice din Europa (capitolul 6.1.).
2. Asocierile hormonale triple și cvaduple au o incidență crescută pe teritoriul Republicii Moldova, fiind dominate de patternul solid acidofil și papilar bazofil (capitolul 6.1.).
3. Factorii moleculari cu un rol prognostic și terapeutic potențial în adenoamele hipofizare sunt următorii: două subtipuri moleculare de celule foliculostelate respectiv GFAP+/VEGF+/S100 și GFAP-/S100+/EGFR+, precum și varianta clasică GFAP+/S100+ (capitolul 4.2.).
4. Combinația S100+/EGFR+ are un comportament agresiv și o capacitate de invazie și recurență crescute, ceea ce denotă un pronostic nefavorabil în evoluția acestor tipuri de adenoame (capitolul 5.3.).
5. Factorii de creștere de tipul VEGF, PDGF se exprimă diferențiat în adenoamele hipofizare și au o corelație semnificativ statistică cu profilul hormonal (capitolul 5.1.).
6. Datele obținute sugerează existența unor forme moleculare distincte în cadrul acelorași forme histopatologice, care au un comportament diferit și un pronostic variabil, dependent de profilul molecular (capitolul 5).
7. Inițierea unei terapii personalizate țintite bazate pe expresia diferențiată a acestor markeri (GFAP, S100) ar putea îmbunătăți pronosticul pe termen lung al pacienților cu adenoame hipofizare, în special în cazul recurențelor (capitolul 4.2.).
8. Identificarea unor potențiali factori etiologici sau comportamentali locali, care pot să influențeze variabilitatea adenoamelor hipofizare, reprezintă o direcție de viitor al prezentului studiu (capitolul 6).
9. Identificarea expresiei și distribuției fracțiunii inhibitorii a VEGF și a EG VEGF, influențează vascularizarea tumorilor și, respectiv, evoluția acestora (capitolul 5.1.).
10. Hibridizarea in situ a identificat VEGF, exprimat din punct de vedere proteic și genic, drept factor cu cele mai mari șanse de succes în vederea aplicării dublei terapii țintite, datorită expresiei sale în celulele tumorale și celulele folicular stelate (capitolul 5.1.).
11. Corelațiile factorilor de creștere cu profilul hormonal pot fi utile pentru realizarea unei reclasificări a adenoamelor hipofizare bazate pe aspectele moleculare, care permite o abordare clinică, diagnostică și terapeutică personalizată (capitolul 5).

RECOMANDĂRI PRACTICE

I. Pentru suport didactic și instructiv metodic:

1. Se recomandă utilizarea informației obținute la editarea manualelor de histologie, anatomie patologică, endocrinologie, oncochirurgie pentru studenți și rezidenții universităților de medicină precum și pentru instruirea postuniversitară.
2. Rezultatele investigațiilor curente prezintă o sursă de completare importantă pentru clasificarea tumorilor pituitare.
3. Datele obținute despre celulele folicular stelate, pot servi drept bază morfologică pentru cercetări clinice și experimentale complexe ale fiziologiei acestor structuri, studierea morfologiei funcționale a sistemului hipotalamo-pituitar, precum și la elaborarea noilor strategii și metode în tratamentul tumorilor de hipofiză.

II. Pentru clinicieni:

1. Cunoașterea profilului molecular al adenoamelor hipofizare permite inițierea unei terapii personalizate țintite bazate pe expresia diferențiată a acestor markeri ar putea îmbunătăți prognosticul pe termen lung al pacienților cu adenoame hipofizare, mai ales în cazul recurențelor.
2. Rolul fiziologic al celulelor folicular stelate este neclar, deși ar putea fi implicate în reglarea secreției hormonale. Configurația lor și prezența a numeroase granule de secreție sugerează faptul că ar putea fi derivate din celulele secretorii. Relația celule foliculare și celule folicular stelate este încă incomplet studiată.
3. Corelațiile factorilor de creștere cu profilul hormonal pot fi utile pentru realizarea unei reclasificări a adenoamelor hipofizare bazate pe un profil personalizat pentru fiecare pacient în parte, care să permită o stratificare clinică, diagnostică și terapeutică cât mai completă.

III. Pentru instituțiile de cercetare:

1. Pentru reducerea morbidității prin tumori hipofizare este necesar de a studia condițiile de mediu, care par a fi specifice pe teritoriul Republicii Moldova.
2. Identificarea expresiei și distribuției fracțiunii inhibitorii a VEGF precum și a EG VEGF, deschide noi teme de cercetare în domeniul adenoamelor hipofizare, în special pentru identificarea influențelor acestora asupra vascularizației particulare din adenoamele hipofizare, aspect incomplet elucidat până în prezent.

BIBLIOGRAFIE

1. Ambrosi B., Faglia G. Epidemiology of pituitary tumors. In: Faglia G., Beck-Peccoz P., Ambrosi B., Travaglini P., Spada A., editors. Pituitary Adenomas: New Trends in Basic and Clinical Research. Amsterdam. The Netherlands: Excerpta Medica. 1991; p. 159–161.
2. Arita K., Uozumi T., Kuwabara S., Mukada K., Kawamoto K., Takechi A., Onda J., Hara H., Egusa G. A case of pituitary adenoma producing both growth hormone (GH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH). *Endocrinol Jpn.* 1991, Jun; 38(3):271-8.
3. Badiu C., Sava S. Endocrine tumour registry—tools for endocrine epidemiology. *Endocrine Abstracts* .2007; 14:p. 502.
4. Bălinișteanu B., Ceaușu R.A., Cîmpean A.M., Baciș I., Băculescu N., Coculescu M., Raica M. Conventional examination versus immunohistochemistry in the prediction of hormone profile of pituitary adenomas. An analysis on 142 cases. *Rom J. Morphol. Embryol.* 2011; 52(3 Suppl):1041-5.
5. Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States. 2004-2008. 2012; Hinsdale, Ill: CBTRUS.
6. Chanson P., Salenave S. Diagnosis and treatment of pituitary adenomas. *Minerva Endocrinol.* 2004, Dec; 29(4):241-75.
7. Ciccarelli A., Daly A. F., Beckers A. The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary.* 2005; 8(1):3–6. doi: 10.1007/s11102-005-5079-0.
8. Clarke M.J., Erickson D., Castro M.R., Atkinson J.L. Thyroid-stimulating hormone pituitary adenomas. *J Neurosurg.* 2008, Jul; 109(1):17-22.
9. Clayton R. N. Sporadic pituitary tumours: from epidemiology to use of databases. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1999; 13(3):451–460.
10. Cooper O., Ben-Shlomo A., Bonert V., Bannykh S., Mirocha J., Melmed S. Silent corticogonadotrofh adenomas: clinical and cellular characteristics and long-term outcomes. *Horm Cancer.* 2010, Apr; 1(2):80-92.
11. Cooper O., Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012, Aug; 26(4):447-60.
12. Cretella D., Saccani F., Quaini F., Frati C., Lagrasta C., Bonelli M., Caffarra C., Cavazzoni A., Fumarola C., Galetti M., La Monica S., Ampollini L., Tiseo M., Ardizzoni A., Petronini P.G., Alfieri R.R. Trastuzumab emtansine is active on HER-2 overexpressing NSCLC cell lines and overcomes gefitinib resistance. *Mol Cancer.* 2014, Jun 5; 13:143. doi: 10.1186/1476-4598-13-143.
13. Daly A. F., Rixhon M., Adam C., Dempegioti A., Tichomirowa M. A., Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liège, Belgium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2006; 91(12):4769–4775. doi: 10.1210/jc.2006-1668.
14. Davis J. R. E., Farrell W. E., Clayton R. N. Pituitary tumours. *Reproduction.* 2001; 121(3):363–371. doi: 10.1530/rep.0.1210363.
15. Davis N.M., Sokolosky M., Stadelman K., Abrams S.L., Libra M., Candido S., Nicoletti

- F., Polesel J., Maestro R., D'Assoro A., Drobot L., Rakus D., Gizak A., Steelman L.S., McCubrey J.A. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*. 2014, Jul 15; five (13):4603-50.
16. Devnath S., Inoue K. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol*. 2008, Jun; 20(6):687-91.
 17. Ezzat S., Asa S. L. The prevalence of pituitary adenomas. *Cancer* 101:613-619.
 18. Ezzat S., Asa S. L., Couldwell W. T., et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004; 101(3):613–619. doi: 10.1002/cncr.20412.
 19. Fujio S., Ashari, Habu M., Yamahata H., Moinuddin F.M., Bohara M., Arimura H., Nishijima Y., Arita K. Thyroid storm induced by TSH-secreting pituitary adenoma: a case report. *Endocr J*. 2014, Aug; 12.
 20. Furtado S. V., Venkatesh P. K., Ghosal N., Hegde A. S. Coexisting intracranial tumors with pituitary adenomas: genetic association or coincidence? *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2010; 6(2):221–223. doi: 10.4103/0973-1482.65246.
 21. Félix I., Rodríguez Mendoza L., Guinto G., Torres Corzo J., Wussterhaus C. 120 biopsies of pituitary adenomas studied by immunohistochemistry and electron microscopy. A clinico-pathological correlation. *Gac Med Mex*. 1992; 128 (3): 289-95.
 22. Gittleman H., Ostrom Q. T., Farah P. D., et al. Descriptive epidemiology of pituitary tumors in the United States, 2004–2009. *Journal of Neurosurgery*. 2014; 121(3):527–535. doi: 10.3171/2014.5.jns131819.
 23. Gospodarowicz D., Lau K. Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989, Nov 30;165(1):292-8.
 24. Heymach J.V., Lockwood S.J., Herbst R.S., Johnson B.E., Ryan A.J. EGFR biomarkers predict benefit from vandetanib in combination with docetaxel in a randomized phase III study of second line treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2014, Oct; 25(10):1941-8. doi: 10.1093/annonc/mdu269.
 25. Horvath E., Kovacs K. Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol*. 2002, Jul-Aug; 26(4):219-28.
 26. Horvath E., Kovacs K. Gonadotroph adenomas of the human pituitary: sex-related fine-structural dichotomy. A histologic, immunocytochemical, and electronmicroscopic study of 30 tumors. *Am J Pathol*. 1984, Dec; 117(3):429-40.
 27. Horvath E., Stefaneanu L., Kovacs K. Effect of dopamine agonist medication on prolactin producing adenomas a morphological study including immunocytochemistry, electron microscopy and in situ hybridization. *Wichows Arch A Pathol. Anat. Histopathol*. 1991; 418:439-446.
 28. Iacovazzo D., Bianchi A., Lugli F., Milardi D., Giampietro A., Lucci-Cordisco E., Doglietto F., Lauriola L., De Marinis L. Double pituitary adenomas. *Endocrine*. 2013; 43(2):452-7.
 29. Ieni A., Barresi V., Caltabiano R., Cascone A.M., Del Sordo R., Cabibi D., Zeppa P., Lanzafame S., Sidoni A., Franco V., Tuccari G. Discordance rate of HER2 status in primary breast carcinomas versus synchronous axillary lymph node metastases: a multicenter

- retrospective investigation. *Onco Targets Ther.* 2014, Jul 11; 7:1267-72.
30. Inoue K., Couch E.F., Takano K., Ogawa S. The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol.* 1999, Aug; 62(3):205-18.
 31. Jagannathan J., Dumont A.S., Jane J.A. Diagnosis and management of pediatric sellar lesions. *Front Horm. Res.* 2006; 34:83-104.
 32. Juszczak A., Ertorer M. E., Grossman A. The therapy of cushing's disease in adults and children: an update. *Hormone and Metabolic Research.* 2013; 45(2):109–117. doi: 10.1055/s-0032-1330009.
 33. Kontogeorgos G., Horvath E., Kovacs K. Sex-linked ultrastructural dichotomy of gonadotroph adenomas of the human pituitary: an electron microscopic analysis of 145 tumors. *Ultrastruct. Pathol.* 1990, Nov-Dec; 14(6):475-82.
 34. Kovacs K., Horvath E., Stefaneanu L., Bilbao J., Singer W., Muller P.J., Thapar K., Stone E. Pituitary adenoma producing growth hormone and adrenocorticotrofin: a histological, immunocytochemical, electron microscopic, and in situ hybridization study. Case report. *J Neurosurg.* 1998 Jun; 88(6):1111-5.
 35. Melnic E. Corelația imuno-morfologică în adenoamele hipofizare. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale.* Chișinău, 2016, vol. 1(50), p. 191-195. ISSN 1857-0011.
 36. Melnic E. Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare în Republica Moldova. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova,* Chișinău, 2016, vol. 2(8) p. 28-39. ISSN 2345-1467.
 37. Melnic E. S100 protein expression in pituitary adenomas. În: *Curierul Medical.* Chișinău, 2016, vol. 59, nr. 2, p. 48-52. ISSN 1857-0666.
 38. Melnic E. The heterogeneity of histological types of breast cancer: sources, reasons and practical application În: *Curierul Medical.* Chișinău, 2016, vol. 59, nr. 5, p 47-48. ISSN 1857-0666.
 39. Melnic E. The influence of the tumoral cell proliferation rate in pituitary adenoma on expressing other factors with a prognostic role and therapeutic potential. În: *Curierul Medical,* Chișinău, 2015, vol. 58, nr. 4, p. 31-33. ISSN 1857-0666.
 40. Melnic E. The role of VEGF 165b in pituitary adenomas pathogenesis. In : *Research and clinical medicine, The European Journal of Innovative, Integrative and Translational Medicine,* <http://www.resclinmed.eu/current-issue/> 2017, vol. 2, ISSUE 2. 5 p.
 41. Melnic E. Tiparele de creștere și caracteristicile tinctoriale ale adenoamelor hipofizare: particularități identificate la populația Republicii Moldova. Studiu histopatologic descriptiv. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova,* Chișinău, 2015, vol. 6(4), p. 7-17. ISSN 2345-1467.
 42. Melnic E., Cimpean A. M., Băliușteanu B. Comparative assessment of hormone immunoprofile for pituitary adenomas coming from Romania and Republic of Moldova. In: *Virchows Archiv. European Journal of Pathology.* Belgrade, Serbia, 2015, vol. 467, supp.1, p. S73. IF 2,613.
 43. Melnic E., Cimpean A. M., Gaje P. N. et al. Influence of hormone profile on vascular endothelial growth factor (VEGF A) expression in human pituitary adenomas. In: *Anticancer research.*

- Sithonia, Greece, 2014, no. 34(10) p. 5867. IF 1,895.
44. Melnic E., Foca E. Profilul imunohistichimic al adenoamelor hipofizare. Certitudini și controverse. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. Chișinău, 2016, vol. 1(50), p. 356-360. ISSN 1857-0011.
 45. Pereira-Lima J. F., Leães C. G., Neto F. M., Barbosa M. V., Silva A. L., Oliveira M. D. Hyperprolactinemia and body weight: prevalence of obesity and overweight in patients with hyperprolactinemia. *Research Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013; 1, article 2 doi: 10.7243/2053-3640-1-2.
 46. Perry A., Scheithauer B.W. Commentary: Classification and grading of pituitary tumors. Observations of two working neuropathologists. *Acta Neuropathol*. 2006; 111: 68–70.
 47. Qi W., Li X., Zhang Y., Yao R., Qiu W., Tang D., Liang J. Overexpression of Her-2 upregulates FoxM1 in gastric cancer. *Int J Mol Med*. 2014, Jun; 33(6):1531-8.
 48. Raappana A., Koivukangas J., Ebeling T., Pirilä T. Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992–2007. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010; 95(9):4268–4275. doi: 10.1210/jc.2010-0537.
 49. Raica M., Căruntu I.-D., Cimpean A.-M., Suciuc C. *Histologia organelor.*, Ed. Lito. UMF „Victor Babeș” Timișoara, 2009.
 50. Rasul F.T., Jaunmuktane Z., Khan A.A., Phadke R., Powell M. Plurihormonal pituitary adenoma with concomitant adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and growth hormone (GH) secretion: a report of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014, Jan; 156(1):141-6.
 51. Raverot G., Jouanneau E., Trouillas J. Management of endocrine disease: clinicopathological classification and molecular markers of pituitary tumours for personalized therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol*. 2014, Mar 13; 170(4):R121-32.
 52. Renner U., Paez-Pereda M., Arzt E., Stalla G.K. Growth factors and cytokines: function and molecular regulation in pituitary adenomas. *Front Horm Res*. 2004; 32:96-109.
 53. Ryosuke Mori, Naoko Inoshita, Junko Takahashi-Fujigasaki, Tatsuhiko Joki, Hiroshi Nishioka, Toshiaki Abe, Takeshi Fujii, Shozo Yamada. Clinicopathological Features of Growth Hormone-Producing Pituitary Adenomas in 242 Acromegaly Patients: Classification according to Hormone Production and Cytokeratin Distribution. *Endocrinology*. 2013; 1-8 ISRN.
 54. Saeger W., Lüdecke D.K., Buchfelder M., Fahlbusch R., Quabbe H.J., Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol*. 2007, Feb; 156(2):203-16.
 55. Sano T., Kovacs K., Asa S.L., Yamada S., Sanno N., Yokoyama S., Takami H. Pituitary adenoma with “honeycomb Golgi” appearance showing a phenotypic change at recurrence from clinically nonfunctioning to typical Cushing disease. *Endocr Pathol*. 2002; 13(2):125-30.
 56. Sano T., Mader R., Asa S.L., Qian Z.R., Hino A., Yamada S. “Honeycomb Golgi” in pituitary adenomas: not a marker of gonadotroph adenomas. *Endocr Pathol*. 2003; 14(4):363-8.
 57. Shao S., Li X. Clinical features and analysis in 1385 Chinese patients with pituitary adenomas.

- J Neurosurg Sci. 2013, Sep; 57(3):267-75.
58. Skorić T., Korsić M., Zarković K., Plavsić V., Besenski N., Breskovac L., Giljević Z., Paladino J. Clinical and morphological features of undifferentiated monomorphous GH/TSH-secreting pituitaryadenoma. *Eur J Endocrinol.* 1999 Jun; 140(6):528-37.
 59. Sullivan N.J., Tashjian A.H. Platelet-derived growth factor selectively decreases prolactin production in pituitary cells in culture. *Endocrinology.* 1983 Aug; 113(2):639-45.
 60. Sánchez-Ortiga R., Sánchez-Tejada L., Moreno-Perez O., Riesgo P., Niveiro M., Picó Alfonso A.M. Over-expression of vascular endothelial growth factor in pituitary adenomas is associated with extrasellar growth and recurrence. *Pituitary.* 2013; Sep; 16(3):370-7.
 61. Teramoto A., Sanno N., Tahara S., et al. Pathological study of thyrotropin-secreting pituitary adenoma: plurihormonality and medical treatment. *Acta Neuropathol (Berl).* 2004; 108 (2): 147-53.
 62. Thorner M.O., Vance M.L., Laws E.R., et al. The anterior pituitary. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia, Pa: WB Saunders. 1998; 249-340.
 63. Tjornstrand A., Gunnarsson K., Evert M., et al. The incidence rate of pituitary adenomas in western Sweden for the period 2001–2011. *European Journal of Endocrinology.* 2014; 171(4):519–526. doi: 10.1530/eje-14-0144.
 64. Tritos N. A., Biller B. M. Cushing’s disease. *Handbook of Clinical Neurology.* 2014; 124:221–234.
 65. Tritos N. A., Eppakayala S., Swearingen B., Hedley-Whyte E.T., Miller K.K., Nachtigall L.B., Grinspoon S.K., Biller B.M., Klibanski A. Pathologic and clinical features of pituitary adenomas showing TSH immunoreactivity. *Pituitary.* 2013, Sep; 16(3):287-93.
 66. Vlotides G., Cooper O., Chen Y.H., Ren S.G., Greenman Y., Melmed S. Heregulin regulates prolactinoma gene expression. *Cancer Res.* 2009, May 15; 69(10):4209-16.
 67. Wöhrer A., Waldhör T., Heinzl H., et al. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. *Journal of Neuro-Oncology.* 2009; 95(3):401–411. doi: 10.1007/s11060-009-9938-9.
 68. Yamada S., Fukuhara N., Horiguchi K., Yamaguchi-Okada M., Nishioka H., Takeshita A., Takeuchi Y., Ito J., Inoshita N. Clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in thyrotropin-secreting pituitary adenomas: a single-center study of 90 cases. *J Neurosurg.* 2014, Sep; 19: 1-12.
 69. Yamaji T., Ishibashi M., Teramoto A., Fukushima T. Prolactin secretion by mixed ACTH-prolactin pituitary adenoma cells in culture. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1985 Apr; 108(4):456-63.
 70. Zieliński G., Maksymowicz M., Podgórski J., Olszewski W.T. Double, synchronous pituitary adenomas causing acromegaly and Cushing’s disease. A case report and review of literature. *Endocr Pathol.* 2013, Jun; 24(2):92-9.

ADNOTARE

Melnic Eugen

PROFILUL HORMONAL ȘI MARKERI MOLECULARI PREDICTIVI PENTRU EVOLUȚIA ȘI TERAPIA ADENOAMELOR HIPOFIZARE

Teză de doctor habilitat în științe medicale

Localitatea și anul perfectării tezei: municipiul Chișinău, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", 2018.

Structura tezei: Lucrarea conține 196 pagini, cuprinde introducerea, 6 capitole, discuții pe marginea rezultatelor obținute, concluzii și bibliografie din 350 surse, 2 tabele, 95 figuri. Cu referire la tema tezei sunt editate 26 publicații științifice. **Cuvinte Cheie:** adenom hipofizar, patern de creștere, imunohistochimie, profil hormonal, prolactina, profil molecular, hibridizare, factor de creștere, factor de proliferare, arie geografică. **Domeniul de studii:** Anatomie patologică. **Scopul lucrării:** Studiul factorilor moleculari cu rol predictiv și probabil terapeutic abordați dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. **Obiective:** Evaluarea completă a adenoamelor hipofizare prin metode histopatologice, realizarea profilului hormonal și confirmarea diagnosticului prin metode moleculare imunohistochimice. **Noutatea științifică a rezultatelor obținute:** Pentru prima dată a fost efectuat un studiu comparativ al profilului hormonal și markerii moleculari al adenoamelor hipofizare. Rata cazurilor de adenoame hipofizare mixte cu asocieri rare a fost superioară mediei întâlnite în literatura de specialitate. Acest aspect susține prezența unor factori etiopatogenici particulari zonei de unde provin adenoamele hipofizare. În premieră a fost estimat și corelat rolul receptorilor hormoni pituitari și factorii de proliferare. **Rezultatele principale noi pentru știință și practică:** S-a realizat în premiera o analiză a structurii adenoamelor hipofizare în dependență de aria geografică, fapt ce ar permite punerea în evidență a unor factori de mediu implicați în etiologia acestor tumori. **Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării:** Rezultatele privind stabilitatea receptorilor celulari vor duce la reevaluarea tacticii de diagnostic și tratament în practica neuro-terapeutică, indicând necesitatea obligatorie de studiere imunohistochimică a adenoamelor hipofizare. Stabilirea diagnosticului complet are un impact pronostic și terapeutic enorm, eficientizând terapia antitumorală specifică și permițând efectuarea unui tratament personalizat în adenoamele pituitare. **Implementarea în practică:** Rezultatele obținute sunt implementate în tratamentul personalizat și determinarea managementului și factorilor de pronostic a pacienților diagnosticați cu adenom hipofizar în neurochirurgie și endocrinologie.

АННОТАЦИЯ

Мельник Евгений

ГОРМОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ЭВОЛЮЦИИ И ТЕРАПИИ АДЕНОМЫ ГИПОФИЗА

Диссертация доктора хабилитат медицинских наук

Город и год защиты диссертации: Кишинэу, Государственный Университет Медицины и Фармации «Николае Тестемицану», 2018 год.

Структура диссертации: Диссертация содержит 196 страниц, введение, 6 глав, заключение и 350 источника библиографии, 2 таблицы, 95 рисунков. По тематике диссертации опубликованы 26 научных статей. **Ключевые слова:** аденома гипофиза, паттерн роста, иммуногистохимия, гормональный профиль, пролактин, молекулярный профиль, гибридизация, эпидермальный фактор роста, фактор пролиферации, географическая зона.

Область исследования: Патологическая анатомия. **Цель работы:** Изучение молекулярных факторов с прогностической и, вероятно, терапевтической ролью в зависимости от гормонального профиля аденомы гипофиза. **Задачи исследования:** Полномасштабная оценка аденом гипофиза с помощью гистологических методов, гормональное профилирование и иммуногистохимическое подтверждение диагноза при использовании молекулярных методов. **Научная новизна и оригинальность:** впервые было проведено сравнительное исследование гормонального профиля и молекулярных маркеров аденом гипофиза. Частота редко ассоциирующихся смешанных аденом гипофиза выше среднего встречающегося в литературе. Впервые была оценена и коррелирована роль гормональных рецепторов гипофиза и факторов пролиферации. **Основные результаты для науки и практики:** впервые была проведена оценка аденом гипофиза в зависимости от географической зоны, что позволило бы выделить экологические факторы, вовлечённые в этиологию этих опухолей. **Теоретическая значимость и ценность работы:** Выводы о стабильности клеточных рецепторов, приведут к пересмотру тактики диагностики и лечения в нейро-терапевтической практике, что указывает на необходимость иммуногистохимического исследования аденом гипофиза. **Внедрение в практику результатов исследования:** Полученные результаты могут быть внедрены в персонализированное лечение, определение менеджмента и прогностических факторов у больных с диагнозом аденом гипофиза в нейрохирургии и эндокринологии.

ANNOTATION

Melnic Eugen

HORMONAL PROFILE AND PREDICTIVE MOLECULAR MARKERS FOR THE DEVELOPMENT AND THERAPY OF PITUITARY ADENOMAS

PhD thesis in medicine

Place and year of thesis completion: State University of Medicine and Pharmacy “Nicolae Testemitanu”, Chisinau, 2018.

Thesis structure: It contains 196 pages, introduction, six chapters, conclusions, 350 sources of bibliography, 2 tables 95 figures. Twenty-six scientific papers related to the topic of the thesis have been published so far. **Keywords:** pituitary adenoma, growth pattern, immunohistochemistry, hormonal profile, prolactin, molecular profile, hybridization, epidermal growth factor, proliferation factor, geographical area. **Field of study:** Pathology. **The aim of the work:** The revision of the molecular factors that have a predictive and probably therapeutic role depending on the pituitary adenoma hormonal status. **Objectives:** Full assessment of pituitary adenomas by histopathological methods, hormonal profiling and immunohistochemical confirmation of the diagnosis by molecular methods. **Scientific innovation of the obtained results:** A comparative study of hormonal profile and molecular markers of pituitary adenomas has been performed for the first time. The rate of the mixed pituitary adenoma cases of a rare combination was higher than the average one mentioned in specialized literature. This confirms the presence of some etiopathogenic factors typical of the area from where the pituitary adenomas come. The role of pituitary hormone receptors and proliferation factors has been estimated and correlated for the first time. **The new key results for science and practice:** For the first time an analysis of the structure of pituitary adenomas depending on the geographical area was done; this would allow the recording of environmental factors involved in the etiology of these tumors. **Theoretical significance and applicative value of the work:** The results regarding the cellular receptors stability will lead to the re-evaluation of diagnostic and treatment tactics in the neuro-therapeutic practice, indicating the mandatory need for an immunohistochemical study of pituitary adenomas. The complete diagnosis has a great prognostic and therapeutic impact streamlining the specific customized tumor therapy of pituitary adenomas. **Practical implementation:** The obtained results are implemented in the personalized treatment and used for determining the management and the prognostic factors in patients diagnosed with pituitary adenoma in neurosurgery and endocrinology.

MELNIC EUGEN

**PROFILUL HORMONAL ȘI MARKERI MOLECULARI
PREDICTIVI PENTRU EVOLUȚIA ȘI TERAPIA
ADENOAMELOR HIPOFIZARE**

311.02 – Anatomia patologică

Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

Aprobat spre tipar: 23.05.2018

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj 60 ex

Coli de tipar.: ...

Comanda nr.

Tipografia-Sirius SRL
mun. Chișinău, str. A. Lăpușneanu, 2