

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Emilija M. Manojlović Gačić

**IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA
EKSPRESIJE REGULATORNIH
PROTEINA ĆELIJSKOG CIKLUSA I
PROLIFERATIVNOG KI-67 (MIB-1)
INDEKSA U ADENOMIMA HIPOFIZE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Emilija M. Manojlović Gačić

**IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS
OF THE EXPRESSION OF THE CELL
CYCLE REGULATORY PROTEINS AND
PROLIFERATIVE KI-67 (MIB-1) INDEX IN
THE PITUITARY ADENOMAS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

Prof. dr Milica Skender Gazibara

Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Prof. dr Vera Popović Brkić

Klinika za endokrinologiju i bolesti metabolizma, Klinički centar Srbije i

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Jelena Sopta, Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Doc. dr Sandra Đurđević Pekić, Klinika za endokrinologiju i bolesti metabolizma, Klinički centar Srbije i Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Nada Vučković, Centar za patologiju i histologiju, Klinički centar Vojvodine; Katedra za patologiju, Medicinski fakultet u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se svom mentoru, Prof. dr Milici Skender-Gazibari na decenijskoj saradnji protkanoj prenošenjem znanja i iskustva, brojnim korisnim sugestijama i neizmernim razumevanjem.

Zahvalnost dugujem i svom komentoru, Prof. dr Veri Popović-Brkić na ukazanom poverenju, prenesenom znanju i pruženim mogućnostima da svoje znanje usavršim u inostranstvu.

Zahvaljujem se Prof. dr Jacqueline Trouillas, jednom od najvećih svetskih autoriteta iz oblasti patologije hipofize, na tome što je pristala da bude moj učitelj.

Zahvalna sam dr Oliveri Časar-Boroti, značajnom evropskom istraživaču iz oblasti patologije hipofize, na nesebičnoj pomoći prilikom usavršavanja iz oblasti patologije hipofize i izvođenja dela eksperimentalnog rada u Rudbek laboratoriji, Uppsala, Švedska.

Zahvaljujem se prof. dr Gordani Basti-Jovanović, upravniku Instituta za patologiju u periodu izrade eksperimentalnog dela istraživanja, što je omogućila da najveći deo istraživanja bude sproveden na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Ova disertacija je posvećena mojim roditeljima, suprugu i sinu, u znak zahvalnosti za nesebičnu podršku, kao i za razumevanje zbog velike količine mog slobodnog vremena utkanog u ovo istraživanje.

IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA EKSPRESIJE REGULATORNIH PROTEINA ĆELIJSKOG CIKLUSA I PROLIFERATIVNOG KI-67 (MIB-1) INDEKSA U ADENOMIMA HIPOFIZE

REZIME:

Adenomi hipofize su najčešći primarni tumori hipofize. Predstavljaju oko 15% svih intrakranijalnih tumora, i uzgredan nalaz na oko 20% autopsija. Više od 95% adenoma hipofize karakteriše benigno ponašanje. Preostalih 5% pripada atipičnim adenomima, dok je maligna transformacija adenoma hipofize izuzetno retka. Aktuelna klasifikacija adenoma hipofize Svetske zdravstvene organizacije se zasniva na imunohistohemijskoj ekspresiji hormona adenohipofize, transkripcionih faktora, citokeratina 8, Ki-67 i p53.

Ćelijski ciklus se tradicionalno deli na 4 faze, koje su deo kontinuuma: G1, S, G2 i M, dok je G0 faza faza mirovanja. U kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa (G1/S i G2/M) dolazi do zastoja ukoliko je detektovana nepravilnost u sintezi DNK. Ključnu ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa imaju inhibitori ciklin zavisnih kinaza, od kojih su najznačajniji, p16 i p21, obrađeni u ovom istraživanju. Ovi markeri se zato smatraju i markerima senescencije, stanja ireverzibilnog izlaska ćelije iz ćelijskog ciklusa.

Ki-67 je protein koji se detektuje u jedru ćelija u svim fazama ćelijskog ciklusa, izuzev G0 faze. Pored toga što omogućava procenu procenta ćelija koje se nalaze u ćelijskom ciklusu, kod adenoma hipofize ima i dijagnostički i prognostički značaj.

Protein p53 predstavlja čuvara genoma, budući da se sintetiše nakon detekcije poremećaja DNK. Ovaj protein dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa, čija dužina zavisi od veličine popravke. Imunohistohemijska detekcija p53 pozitivnih jedara u adenomima hipofize ima dijagnostičku vrednost, predstavljajući jedan od kriterijuma za dijagnozu atipičnih adenoma i karcinoma hipofize.

Cilj ovog istraživanja je procena aktivacije inhibitora ciklin-zavisnih kinaza p16 i p21 i proliferativnog Ki-67 indeksa u adenomima hipofize, njihovim tipovima i podtipovima, kao i u normalnoj adenohipofizi.

Istraživanje je sprovedeno na 345 adenoma hipofize, od čijih je biopsijskih uzoraka u parafinskim blokovima konstruisan tkivni mikro niz. Kontrolnu grupu su sačinjavale adenohipofize koje su akcidentalno uklonjene prilikom hirurške intervencije na adenomima hipofize. Adenomi hipofize su klasifikovani u skladu sa kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije, a nakon imunohistohemijske aplikacije antitela na citokeratin 8 (CK8), hormon rasta (HR), prolaktin (PRL), tireostimulišući hormon (TSH), folikulostimulišući hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH), adrenokortikotrofni hormon (ACTH), steroidni faktor rasta 1 (SF-1) i za hipofizu specifični pozitivni transkripcioni faktor (eng. Pituitary-specific positive transcription factor 1 - PIT1). Nakon toga su primenjena antitela na p16, p21, Ki-67, p53 i sa senescencijom udruženu beta-galaktozidazu (SA- β -GAL).

Adenomi hipofize, posmatrani kao jedna grupa su pokazali statistički značajno niži procenat p16 pozitivnih jedara u odnosu na normalnu hipofizu. Procenat p16 pozitivnih jedara je bio vrlo sličan između tipova i podtipova adenoma hipofize. Takođe, adenomi hipofize, prikazani kao grupa su pokazali statistički značajno niže vrednosti procenta p21 pozitivnih jedara u odnosu na normalnu hipofizu. Međutim, među tipovima adenoma hipofize, HR produkujući adenomi su pokazali najviše vrednosti, a gonadotrofni najniže. Posmatrajući podtipove HR produkujućih adenoma, slabo granulirani adenomi su pokazali statistički značajno više vrednosti u odnosu na gusto granulirane adenome, koje su ujedno bile najviše u odnosu na sve analizirane tipove i podtipove adenoma.

Procenat Ki-67 pozitivnih jedara je bio nizak, osim u 4 adenoma koji su imali vrednosti veće od 3%.

Procenat p53 pozitivnih jedara je takođe bio vrlo nizak i sličnih vrednosti u svim tipovima adenoma hipofize.

Adenomi hipofize su, posmatrani kao jedna grupa, pokazali statistički značajno jači intenzitet bojenja na SA- β -GAL u odnosu na normalnu hipofizu. Među tipovima adenoma hipofize, najviše vrednosti su uočene kod HR produkujućih adenoma. Gusto granulirani HR produkujući adenomi su pokazali statistički značajno intenzivnije bojenje u odnosu na slabo granulirane HR produkujuće adenome.

Pozitivna korelacija je uočena između citoplazmatskog p21 bojenja i indeksa telesne mase pacijenata. Mikroadenomi su pokazali statistički više vrednosti procenta p16

pozitivnih jedara u odnosu na makroadenome. Adenomi hipofize sa supraselarnim i/ili paraselarnim širenjem su pokazali statistički više vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa nego adenomi koji su rasli u drugim smerovima. Nuklearna p21 ekspresija je pokazala statistički značajnu korelaciju sa citoplazmatskom p21 ekspresijom, Ki-67, p53 i SA- β -GAL, dok je citoplazmatska p21 ekspresija pozitivno korelisana sa Ki-67 i SA- β -GAL. P16 je pozitivno korelisan sa p53 i SA- β -GAL.

Naši rezultati ukazuju da se regulacija ćelijskog ciklusa u adenomima hipofize razlikuje u zavisnosti od tipa adenoma. Pokazano je, prema našim saznanjima, po prvi put u literaturi, da su razlike u regulaciji ćelijskog ciklusa prisutne i unutar podtipova HR produkujućih adenoma hipofize. Statistički značajno niža vrednost procenta p16 pozitivnih jedara u adenomima hipofize u odnosu na vrednosti u normalnoj adenohipofizi ukazuje da bi inhibicija produkcije mogla biti deo tumorigeneze adenoma hipofize. Niže vrednosti procenta p21 pozitivnih jedara u adenomima hipofize, u odnosu na normalnu hipofizu, koje su pokazivale varijabilnost između tipova adenoma hipofize, ukazuju da bi ekspresija ovog inhibitora ciklin zavisne kinaze mogla biti hormonski zavisna. Najviše vrednosti procenta p21 pozitivnih jedara kod slabo granuliranih HR produkujućih adenoma, koje su bile statistički značajno više u odnosu na vrednosti kod gusto granuliranih adenoma, ukazuju da bi i mehanizam stvaranja granuliranosti HR produkujućih adenoma na neki način mogao biti povezan sa p21 nuklearnom ekspresijom. Niske vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa koje su bile niske u svim tipovima adenoma, a koje su niže u odnosu na literaturne vrednosti, bi se mogle objasniti razlikom u tehnici brojanja. Vrlo niske vrednosti p53 pozitivnih jedara u svim tipovima adenoma hipofize su u skladu sa benignim ponašanjem adenoma hipofize. Značajno intenzivnije bojenje na SA- β -GAL u grupi adenoma hipofize u poređenju sa normalnom hipofizom, koje je bilo najizraženije kod HR produkujućih adenoma ukazuje na aktivaciju procesa senescencije u adenomima hipofize. Statistički značajno intenzivnije bojenje uočeno kod gusto granuliranih adenoma, u odnosu na slabo granulirane adenome, ukazuje na uticaj granuliranosti adenoma na aktivnost SA- β -GAL. Statistički značajan pad procenta p16 pozitivnih jedara kod makroadenoma u odnosu na mikroadenome podržava hipotezu da smanjenje aktivnosti p16 u adenomima hipofize ima značajnu ulogu u tumorigenezi. Naše istraživanje potvrđuje da

proliferativni Ki-67 indeks pored dijagnostičkog ima i prognostički značaj, budući da su njegove vrednosti varirale u zavisnosti od smera širenja adenoma hipofize. Hirurška intervencija adenoma hipofize najverovatnije ne uzrokuje promene u aktivaciji senescencije. Brojne statistički značajne korelacije između analiziranih markera ukazuju na kompleksnost njihove aktivacije, kao i na potrebu za upotrebom dopunskih dijagnostičkih metoda, budući da su literaturni podaci na ovu temu heterogeni.

KLJUČNE REČI: Adenomi hipofize; ćelijski ciklus, p16; p21; Ki-67; senescencija.

NAUČNA OBLAST: Molekularna medicina; patologija.

UŽA NAUČNA OBLAST: Patologija; neuropatologija; endokrina patologija.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF THE CELL CYCLE REGULATORY PROTEINS AND THE PROLIFERATIVE KI-67 (MIB-1) INDEX IN THE PITUITARY ADENOMAS

ABSTRACT:

Pituitary adenomas (PA) are the most frequent primary pituitary tumors. They comprise up to 15% of all intracranial tumors, and they are found as an incidental finding in up to 20% of all autopsies. PAs are characterized by benign clinical behavior, with the weak tendency to malignant transformation. The WHO classification of PAs is based on immunohistochemical analysis of positivity of anterior pituitary hormones, transcriptional factors, cytokeratin 8, Ki-67 and p53.

The cell cycle is traditionally divided into 4 phases, all of them being a part of the continuum: G1, S, G2 and M. G0 is recognized as the quiescent phase. The cell cycle is halted in checkpoints (G1/S and G2/M) after detection of any DNA irregularity. Cyclin-dependent kinases belong to the group of the most powerful cell cycle inhibitors, p16 and p21 being used in this work. These markers are also known as markers of an irreversible arrest of cell proliferation, known as senescence.

Protein Ki-67 is detected in nuclei of all cells that are out of G0 phase of cell cycle. Furthermore, immunohistochemical Ki-67 detection had diagnostic and prognostic significance in PAs.

Protein p53 is known as „guardian of genome“, given that it is synthesised after any DNA damage. This protein causes the halting of the cell cycle, which is qualified by the extension of DNA damage. Immunohistochemical p53 detection in PAs is of diagnostic importance, being one of the criteria for the diagnosis of atypical adenomas and pituitary carcinomas.

The aim of this study is the analysis of activation of cell-cycle inhibitors p16 and p21, p53 protein and proliferative Ki-67 index in types and subtypes of PAs. These markers are also analyzed in the normal anterior pituitary.

The investigation is performed on 345 PAs, which paraffin blocks were used as donor blocks for tissue micro array (TMA) construction. The control group was made of

normal anterior pituitaries, which were a part of resection specimen for surgery of PAs. PAs are classified according to the WHO criteria, after immunohistochemical application of following antibodies: cytokeratin 8, growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), prolactin (PRL), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), steroidogenic factor 1 (SF-1) and pituitary-specific transcription factor 1 (PIT1). Afterwards, immunohistochemistry was performed for p16, p21, Ki-67, p53 and senescence-associated β -galactosidase (SA- β -GAL).

PAs, analyzed as a single group, showed statistically significant decrease of the percentage of p16 positive nuclei, compared to the normal pituitary. The percentage of p16 positive nuclei did not vary significantly among PA types and subtypes. The group of PA demonstrated the statistically significant decrease in the percentage of p21 positive nuclei, compared to the normal pituitary. GH-producing adenomas displayed the highest, and the gonadotroph adenomas the lowest levels of p21 positive nuclei among PA types. In the analysis of GH-producing adenoma subtypes, sparsely granulated (SG) GH PAs showed the highest levels of p21 positive nuclei among all PA types, which were significantly higher compared to the densely granulated (DG) GH PAs. The proliferative Ki-67 index was very low in all adenomas, except for only 4 cases, where it was higher than 3%. The percentage of p53 positive nuclei was very low, too, with similar values among PA types. PAs, analyzed together as a single group, demonstrated significantly higher SA- β -GAL staining intensity, compared to the normal anterior pituitary. The highest SA- β -GAL staining intensity was observed in GH-producing adenomas. DG-GH adenomas demonstrated statistically more intensive staining intensity, compared to SG-GH adenomas. Cytoplasmic p21 staining correlated positively with body mass index of patients.

Microadenomas demonstrated the statistically higher percentage of p16 positive nuclei than macroadenomas. PAs with suprasellar and/or parasellar invasion presented statistically higher proliferative Ki-67 index, compared to PAs with invasion in the other directions. The percentage of p21 positive nuclei correlated positively with cytoplasmic p21 expression, Ki-67, p53 and SA- β -GAL. Cytoplasmic p21 positivity correlated positively with Ki-67 and SA- β -GAL. P16 was correlated positively with p53 and SA- β -GAL.

Our results suggest that cell cycle regulation is different in different PA types. We demonstrated for the first time, to the best of our knowledge, differences in cell cycle regulation among GH adenoma subtypes. Significantly lower percentage of p16 positive nuclei in PAs, compared to the normal pituitary, followed by the lack of differences among PA types, suggests that the lack of p16 activity could be a part of PA tumorigenesis. The lower percentage of the p21 positive nuclei, compared to the normal pituitary, and significant differences among PA types propose that its expression could be influenced by hormonal activity. Significantly higher percentage of p21 positive nuclei in SG-GH, compared to DG-GH adenomas, suggests that granulation pattern could be also involved in p21 activation. The lower proliferative Ki-67 index in our investigation, compared to indices in previous works, could be explained at least by the differences in counting technique. Very low percentage of p53 positive nuclei in all PA types is in accordance with previous investigations. Significantly more intensive SA- β -GAL staining in the group of PA, which reached the highest levels in GH-producing adenomas, suggests the activation of senescence program in PAs. The more intensive SA- β -GAL staining in DG-GH, compared to SG-GH suggests the involvement of granulation pattern in senescence activation. The significant decrease of percentage of p16 positive nuclei in macroadenomas, compared to microadenomas, supports the influence of p16 loss in PA tumorigenesis. Our investigation confirms that proliferative Ki-67 index has also the prognostic role, besides its diagnostic function, bearing in mind that its values varied depending on the direction of invasion. Surgical treatment probably do not influence senescence activation in PAs. Numerous significant correlations between analyzed markers emphasise complexity in their activation, as well as the need for application of additional analytic methods.

KEY WORDS: Pituitary adenoma; cell-cycle; p16; 21; senescence.

SCIENTIFIC FIELD: Molecular medicine; pathology

SPECIAL SCIENTIFIC FIELD: Pathology; neuropathology; endocrine pathology

SADRŽAJ:

1. Uvod.....	1
1.1. Normalna morfologija hipofize i njeni odnosi sa okolnim strukturama.....	1
1.2. Adenomi hipofize – opšte karakteristike.....	3
1.2.1. Definicija i epidemiologija.....	3
1.2.2. Podela adenoma hipofize.....	4
1.2.3. Histološke i imunohistohemijske karakteristike adenoma hipofi.....	5
1.2.4. Kliničke karakteristike adenoma hipofize.....	11
1.3. Ćelijski ciklus – opšte karakteristike.....	14
1.3.1. Uloga p16 u regulaciji ćelijskog ciklusa.....	14
1.3.2. Uloga p21 u regulaciji ćelijskog ciklusa.....	15
1.3.3. Uloga p53 u regulaciji ćelijskog ciklusa.....	16
1.3.4. Ki-67 i ćelijski ciklus.....	16
1.4. Senescencija i ćelijski ciklus.....	17
1.5. Tkivni mikro niz.....	18
2. Ciljevi istraživanja.....	19
3. Materijal i metode.....	20
3.1. Mesto i period istraživanja.....	20
3.2. Selekcija ispitanika.....	20
3.3. Instrumenti merenja.....	21
3.4. Statistička analiza.....	23
4. Rezultati.....	25
4.1. Distribucija pacijenata eksperimentalne grupe po polu i uzrastu.....	25
4.2. Distribucija adenoma hipofize u odnosu na klasifikaciju SZO.....	26
4.3. Distribucija pacijenata kontrolnih grupa grupe po polu i uzrastu.....	26
4.3.1. Biopsijska kontrolna grupa.....	26
4.3.2. Autopsijska kontrolna grupa.....	27
4.4. Ekspresija p16 u adenomima hipofize.....	28
4.5. Nuklearna ekspresija p21 u adenomima hipofize.....	31
4.6. Citoplazmatska p21 ekspresija u adenomima hipofize.....	34

4.7.	Ekspresija SA- β -GAL u adenomima hipofize.....	37
4.8.	Ki-67 u adenomima hipofize.....	42
4.9.	p53 u adenomima hipofize	44
4.10.	Razlike između kontrolnih grupa.....	45
4.11.	Razlike između kontrolne grupe i adenoma hipofize primazanih kao jedna grupa.....	49
4.12.	Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u ekspresiji p16.....	49
4.13.	Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u nuklearnoj p21 ekspresiji	50
4.14.	Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u citoplazmatskoj p21 ekspresiji.....	50
4.15.	Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u ekspresiji SA- β -GAL.....	50
4.16.	Poređenje ekspresije p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL grupe recidivantnih sa grupom nerecidivantnih adenoma.....	51
4.17.	Ispitivanje korelacije ekspresije p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL sa kliničkim podacima pacijenata (pol, uzrast, indeks telesne mase, veličina tumora, invazivnost tumora).....	53
4.18.	Ispitivanje međusobnih korelacija p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL.....	59
5.	Diskusija.....	61
6.	Zaključci.....	85
7.	Literatura.....	87

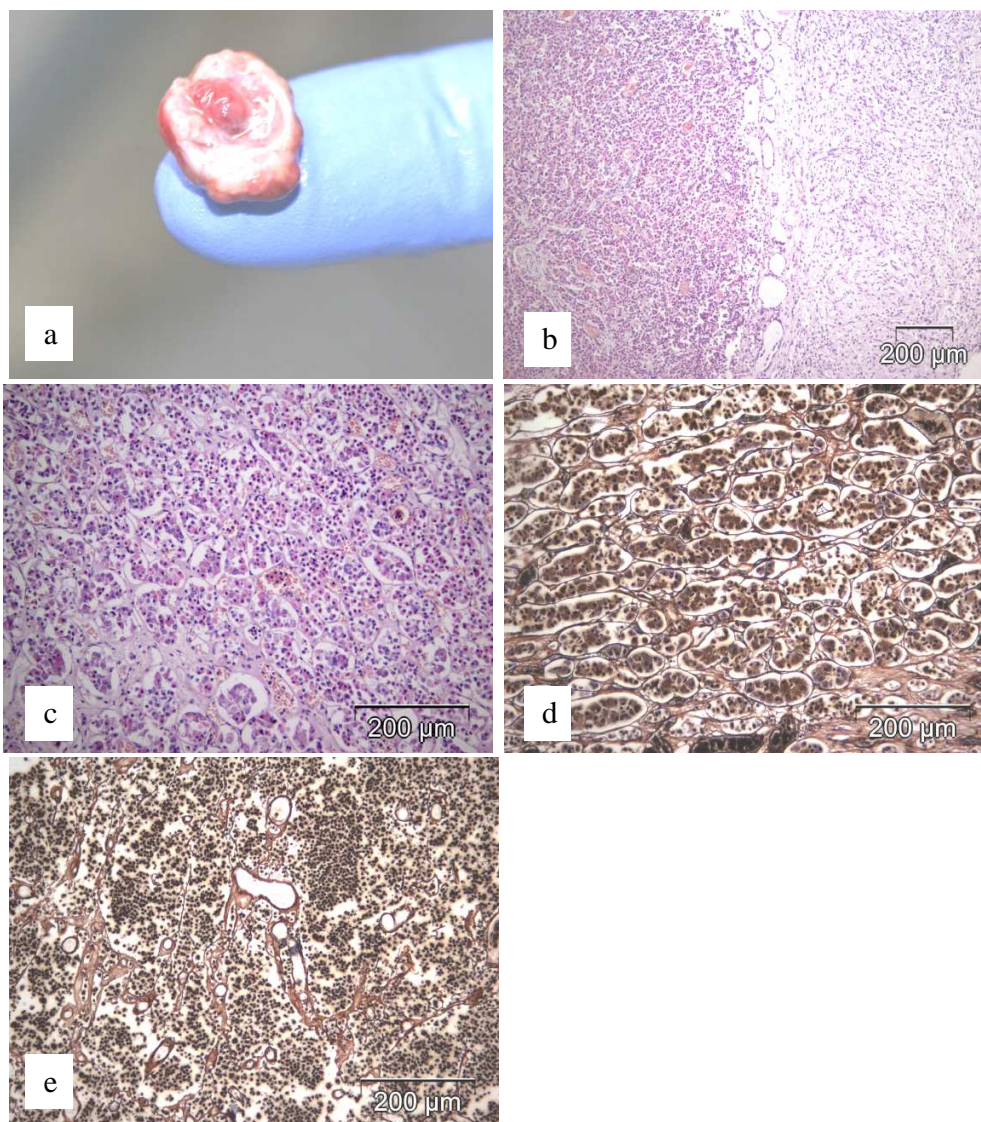
1. UVOD

1.1. NORMALNA MORFOLOGIJA HIPOFIZE I NJENI ODNOSI SA OKOLNIM STRUKTURAMA

Hipofiza je endokrina žlezda koja je smeštena u srednjoj lobanjskoj jami, u delu sfenoidne kosti nazvanom „sella turcica“, gde je pokrivena dijafragmom dure mater (dijafragma sele). Hipofiza je prosečne težine 0.5 g i dimenzija 13x9x6 mm sa minimalnim varijacijama u odnosu na pol. Dimenzije hipofize variraju u odnosu na životnu dob, tako da se njene dimenzije lakostepeno smanjuju u starosti (1, 2). Anatomski i funkcionalno je podeljena na tri dela / lobusa: prednji, koji nosi naziv adenohipofiza, srednji/intermedijarni i zadnji, koji se naziva neurohipofiza (Slika 1, a i b).

Adenohipofiza je acinusne građe, sastavljena od mešavine ćelija koje se različito boje standardnim hematoksilin-eozin (HE) bojenjem (acidofilne, hromofobne i bazofilne) (Slika 1C). Acinusna građa adenohipofize se jasnije vizualizuje srebrnom impregnacijom retikulina po Gomoriju (Slika 1D). Ćelije adenohipofize proizvode sledeće hormone: hormon rasta (HR), prolaktin (PRL), tireostimulirajući hormon (TSH), folikulostimulirajući hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH) i adrenokortikotropni hormon (ACTH). Smatra se da se ćelije koje proizvode HR i PRL dominantno nalaze u bočnim delovima adenohipofize (na „krilima“), ACTH i TSH ćelije su dominantno lokalizovane u centralnom delu adenohipofize („centralni klin“), dok su FSH i LH proizvodeće ćelije ravnomerno raspoređene po celoj adenohipofizi. Između hormon proizvodećih ćelija se nalaze retke, razbacane folikulostelate ćelije, koje igraju ulogu u reparaciji hipofize (3).

Srednji ili intermedijarni lobus hipofize je rudimentiran i predstavlja ostatak Ratkeovog špaga. U ovoj uskoj zoni se nalaze retke ćelije koje luče melanotropni hormon (3).



Slika 1: Morfologija normalne hipofize, (a) makroskopski aspekt hipofize (autopsija broj 1030/15, Institut za patologiju); (b) prednji lobus hipofize - adenohipofiza (levo), intermedijarni lobus (u sredini) i zadnji lobus (neurohipofiza) (autopsija broj 351/14, Institut za patologiju, HE, x100); (c) adenohipofiza koju sačinjavaju acidofilne, bazofilne i hromofobne ćelije (autopsija broj 427/14, Institut za patologiju, HE, x200); (d) acinusna građa adenohipofize je naglašena srebrnom impregnacijom retikulina (autopsija broj 592/13, Institut za patologiju, Gomori metoda x200); (e) za razliku od adenohipofize, acinusna građa je narušena u tkivu adenoma (incidentalom, autopsija broj 592/13, Institut za patologiju, Gomori metoda, x200).

Zadnji lobus hipofize ili neurohipofiza je sastavljena iz pituicita i aksona hipotalamičkih neurona supraoptičkog i paraventricularnog jedra, koja produkuju oksitocin i vazopresin (3).

Sagledavanje odnosa hipofize sa okolnim strukturama je od značaja za razumevanje simptomatologije tumora hipofize, a o čemu će se govoriti u daljem tekstu. Lateralno od hipofize se nalaze kavernozi sinusi, kroz koje prolaze unutrašnja karotidna arterija, III, IV i VI kranijalni nerv, kao i prve dve grane trigeminalnog (V kranijalnog) nerva. Iznad hipofize i dijafragme sele se na 5-10mm nalazi hijazma optičkih nerava, dok se ispod nalazi sfenoidalni sinus (4).

Tumori hipofize su prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO), neoplazme lokalizovane u seli turciki (5). Veliku većinu tumora hipofize predstavljaju adenomi hipofize, koji potiču od ćelija adenohipofize, pri čemu karcinomi hipofize predstavljaju retkost. Preostale tumore hipofize predstavljaju mezenhimalni i neuralni tumori, kao i metastaze (5, 6).

1.2. ADENOMI HIPOFIZE – OPŠTE KARAKTERISTIKE

1.2.1. Definicija i epidemiologija

Adenomi hipofize su najčešći primarni tumori hipofize. Većinom su benigne prirode. Dovode do morbiditeta kompresijom okolnih struktura i/ili hiper ili hiposekrecijom hormona adenohipofize. Nastaju monoklonalnom proliferacijom ćelija adenohipofize. Predstavljaju 10-15% svih intrakranijalnih neoplazmi, i nalaze se na trećem mestu po učestalosti, iza glioma i meningioma (5). Pre razvoja vizualizacionih tehnika (kompjuterizovane tomografije i nuklearne magnetne rezonance) su smatrani retkim neoplazmama. Izračunavanje incidencije i prevalencije adenoma hipofize je veliki izazov, budući da neki od njih prouzrokuju izražene simptome, neki dovode do nespecifičnih

tegoba, dok su neki asimptomatski, i bivaju otkriveni incidentalno (7, 8). U autopsijskom materijalu učestalost adenoma hipofize iznosi 1-35%, prosečno 14.4% (9). U opštoj populaciji, prevalencija adenoma hipofize iznosi 16.7% (9). Adenomi hipofize su retki u pedijatrijskoj populaciji, u kojoj predstavljaju 3.5-6% hirurški tretiranih tumora hipofize (10).

1.2.2. Podela adenoma hipofize

Adenomi hipofize se mogu podeliti da osnovu više parametara.

Na osnovu veličine, adenomi hipofize se dele na mikroadenome (prečnika ≤ 10 mm), makroadenome (prečnika između 10 i 40mm) i gigantske adenome (prečnika ≥ 40 mm) (5).

Klinički, na osnovu sekrecije hormona, adenomi hipofize se dele na nefunkcionalne i funkcionalne. Nefunkcionalni (ili „nemi“) adenomi hipofize mogu da nastanu proliferacijom bilo kojeg tipa ćelija adenohipofize. Ukoliko ne sekretuju dovoljnu količinu hormona da bi doveli do povećanja koncentracije hormona u serumu, nazivaju se „totalno nemi“. Adenomi hipofize koji dovode do povećanja koncentracije hormona u serumu, ali ne dovode do kliničkih simptoma se nazivaju „klinički nemi“ (11). Funkcionalni adenomi dovode do nastanka kliničkih sindroma, koji su posledica hipersekrecije nekog od hormona adenohipofize (12).

U odnosu na invazivnost okolnih struktura, adenomi hipofize se dele na invazivne i neinvazivne. Razlikujemo tri tipa invazivnosti adenoma hipofize: histološki, radiološki i hirurški (13, 14). Histološka invazivnost se može procenjivati samo u onim uzorcima adenoma hipofize u kojima postoji još neko tkivo (najčešće dura, mukoza paranazalnog sinusa, tkivo (adeno)hipofize ili kost) u odnosu na koje se može proceniti invazivnost. Radiološka invazivnost adenoma hipofize se procenjuje na osnovu snimaka načinjenih metodom nuklearne magnetne resonance (NMR). Prva radiološka klasifikacija adenoma hipofize koja se odnosi na invazivnost tumora datira iz 1976. godine (15), i ubrzo je bila zamenjena Knosp klasifikacijom, koja se više fokusirala na paraselarni rast tumora (16). U

današnje vreme je široko prihvaćena SIPAP radiološka klasifikacija adenoma hipofize, koja gradira adenome u odnosu na invaziju u šest pravaca (supraselarno, infraselarno, paraselarno (levo i desno), retroselarno i anterotelarno) (17). Hirurška invazivnost se procenjuje od strane hirurga tokom hirurške intervencije. Histološka i radiološka invazivnost adenoma hipofize se smatraju vrlo važnim prognostičkim parametrima, pa su zbog toga uvršćeni u parametre nove, prve kliničko-patološke klasifikacije ovih tumora (13).

Histološki, adenome hipofize karakteriše gubitak acinusne građe, što se jasno vizualizuje srebrnom impregnacijom preparata metodom po Gomoriju (Slika 1E). Adenomi hipofize se, kao i ćelije adenohipofize, dele na osnovu svojih tinktorijalnih svojstava prilikom bojenja standardnom hematoksilin-eozin (H&E) metodom na acidofilne, bazofilne i hromofobne adenome. Acidofilni adenomi se karakterišu intenzivno tamno ružičasto obojenom citoplazmom. Kod bazofilnih adenoma citoplazma je obojena (tamno) ljubičasto. Ćelije hromofobnih adenoma imaju svetlo ružičastu do potpuno amfofilnu (svetlu) citoplazmu (5).

Prema kriterijumima SZO, adenomi hipofize se dele na osnovu imunohistohemijske ekspresije hormona adenohipofize: HR, PRL, TSH, FSH, LH i ACTH, o čemu će biti reči u daljem tekstu.

1.2.3. Histološke i imunohistohemijske karakteristike adenoma hipofize

HR produkujući adenomi hipofize

Hormon rasta produkujući adenomi hipofize predstavljaju 25-30% svih adenoma hipofize koji su hirurški tretirani (18). U najvećem broju slučajeva su klinički funkcionalni tumori koji dovode do akromegalije, odnosno gigantizma, u zavisnosti od uzrasnog doba pacijenta. Nemi HR produkujući tumori su veoma retki. Prema kriterijumima još aktuelne klasifikacije SZO iz 2004 godine, razlikuju se sledeći podtipovi HR produkujućih adenoma hipofize (5):

Slabo granulirani HR produkujući adenom hipofize je celularan i hromofoban. Građen je od sitnih ćelija do ćelija srednje veličine, jasnih granica. Jedra su krupna, neretko nepravilna i nejednaka (nuklearni pleomorfizam), svetlog hromatina i naglašenog nukleolusa (uočljivog sa uveličanja x100). U citoplazmi ovih tumora se često uočava svetlo ružičasta okruglasta inkluzija koja dislocira jedro. Ove inkluzije, nazvane fibrozna tela, se intenzivno prebojavaju imunohistohemijskim bojenjem na citokeratin (CK) 8, ili aplikacijom mešavine antitela na CK koja u sebi sadrže CK8 (na primer, CAM5.2, AE1/AE3). Fibrozna tela prisutna u više od 50% tumorskih ćelija predstavljaju dijagnostički kriterijum za diferencijaciju ovog tipa HR produkujućeg adenoma od gusto granuliranog. Slabo granulirani HR produkujući adenomi hipofize pokazuju varijabilnu imunopozitivnost na HR, koja nekada može biti izuzetno oskudna (5, 19).

Gusto granulirani HR produkujući adenom hipofize je difuznog tipa rasta, građen od ćelija srednje veličine, jasnih granica. Citoplazma je umerene količine, granulirana, izrazito acidofilna (acidofilni adenom). Jedra su centralno postavljena, okruglasta, svetlog hromatina i naglašenog nukleolusa. Imunohistohemijski, citoplazma gusto granuliranih HR produkujućih adenoma je difuzno intenzivno pozitivna na CK8, mada se opisuju i brojne varijante polumesečaste, perinuklearne pozitivnosti (19, 20). Sve tumorske ćelije pokazuju difuznu, intenzivnu i uniformnu imunopozitivnost na HR (5, 19).

Mešoviti, PRL i HR, produkujući adenom hipofize se karakteriše varijabilnom mešavinom dva tipa tumorskih ćelija: hromofobnih, koje pokazuju PRL imunopozitivnost, i acidofilnih, koje su GH imunopozitivne. Tumorske ćelije su negativne na preostale hormonske markere (FSH, LH, TSH i ACTH), i pokazuju jedan od dva obrasca granuliranosti (5).

Plurihormonalni HR produkujući adenom hipofize histološki mogu biti ili acidofilni ili hromofobni. Najčešće su difuznog načina rasta, građeni od ćelija jasnih granica. Njihova glavna karakteristika je plurihormonalnost, tj prisustvo imunopozitivnosti na PRL, FSH, LH ili TSH, pored imunopozitivnosti na HR (5, 21). Po pitanju granuliranosti, plurihormonalni HR produkujući adenomi su većinom gusto granulirani (19).

Mamosomatotrofni adenom spada u retke varijante HR produkujućih adenoma. Histološki, tumor je difuznog tipa rasta, građen od ćelija bogate acidofilne citoplazme, krupnog okruglastog centralno postavljenog jedra, svetlog hromatina i naglašenog nukleolusa. Imunohistohemijski, sve tumorske ćelije pokazuju imunopozitivnost na PRL i HR (5, 21).

Acidofilni "stem cell" adenom predstavlja najređu varijantu, koju čini do 1% HR produkujućih adenoma. Difuznog je načina rasta, građen većinom od hromofobnih ćelija sa primesama acidofilije. Nuklearni pleomorfizam može biti izražen. Glavno obeležje ovog podtipa adenoma predstavljaju vakuole, koje mogu dostići veličinu jedra, koje predstavljaju akumulirane megamitohondrije. Imunohistohemijski, ovi adenomi pokazuju difuznu i intenzivnu PRL imunopozitivnost, dok je njihova GH imunoreaktivnost lakostepena do negativna (5, 21).

PRL produkujući adenomi hipofize

PRL produkujući adenomi hipofize (prolaktinomi) predstavljaju najčešće adenome hipofize. Međutim, nakon uvođenja dopaminskih agonista u terapiju prolaktinoma (22), broj prolaktinoma u hirurškim serijama značajno opada budući da se hirurški tretiraju isključivo retki, farmakorezistentni slučajevi. Prema kriterijumima SZO, razlikuju se dva podtipa prolaktinoma (5).

Slabo granulirani PRL produkujući adenom je najčešći podtip prolaktinoma. Ovi tumori su najčešće difuznog tipa rasta, mada mogu biti i papilarni. U njima je vrlo često izražena kongestija. Ćelije su relativno krupne, hromofobne, nejasnih granica, često izdužene. Nuklearni i ćelijski pleomorfizam je neznatan i uočava se u retkim pojedinačnim slučajevima. Psamozna telašca se mogu sresti. U intersticijumu se nekad može videti amilod. Imunohistohemijski, ovaj tip tumora se karakteriše intenzivnom PRL imunopozitivnošću u perinuklearnoj, Goldži zoni, dok su ostali hormonski markeri (GH, FSH, LH, TSH i ACTH) negativni (5). Za razliku od HR produkujućih adenoma, gde se granuliranost određivala pomoću obrasca bojenja antitelom na CK8, kod prolaktinoma se granuliranost određuje obrascem imunohistohemijskog bojenja na PRL (5, 23).

Gusto granulirani PRL produkujući adenom je vrlo redak podtip tumora, koji se morfološki razlikuje od slabo granuliranog podtipa adenoma po tome što su njegove ćelije acidofilne, a PRL imunopozitivnost je difuzna citoplazmatska (5, 23).

Od uvođenja dopaminskih agonista u rutinsku terapiju hiperprolaktinemije broj hirurški tretiranih pacijenata sa prolaktinomima je veoma smanjen. Hirurškom tretmanu se podvrgavaju skoro isključivo pacijenti koji su prethodno bili tretirani dopaminskim agonistima. Tretman agonistima dopamina uzrokuje morfološke promene prolaktinoma, u koje spadaju: smanjenje ćelije, najviše na račun citoplazme; povećan nukleo-citoplazmatski odnos; nuklearna hiperhromazija; perivaskularna i intersticijalna fibroza; smanjena PRL imunopozitivnost, koja ponekad može biti veoma oskudna (21).

TSH produkujući adenomi hipofize

TSH produkujući adenomi hipofize su retki tumori, koji predstavljaju oko 1% svih adenoma. Histološki, ovi tumori su solidnog ili sinusoidalnog načina rasta. Stromalna fibroza se često sreće. Ponekad se mogu videti i psamozna telašca. Građeni su od hromofobnih ćelija, najčešće vretenastog oblika, nejasnih granica. Nuklearni pleomorfizam je varijabilnog stepena. Histochemijskim PAS bojenjem se uočavaju sitne PAS pozitivne citoplazmatske globule, koje odgovaraju lizozomima. Imunohistochemijski, TSH pozitivnost je varijabilna, i u većini slučajeva se uočava ispod ćelijske membrane naglašavajući vretenasti oblik i dugačke nastavke ovih ćelija (5, 24).

ACTH produkujući adenomi hipofize

ACTH produkujući adenomi hipofize predstavljaju 10-15% svih adenoma hipofize. U najvećem broju slučajeva tumor je građen od monomorfnih okruglastih ćelija u difuznom ili sinusoidalnom aranžmanu. Ćelije su najčešće bazofilne, intenzivno PAS pozitivne citoplazme. Ovakav nalaz se najčešće sreće kod mikroadenoma. Kod znatno ređih makroadenoma, ćelije su hromofobne i slabo PAS pozitivne. Pleomorfizam i apoptotska telašca se mogu sresti. Jedra su većinom okruglasta, centralno postavljena, sa naglašenim nukleolusom. U okolnoj adenohipofizi, koja je neretko prisutna u hirurškom materijalu

osoba sa ACTH produkujućim adenomom, u kortikotropnim ćelijama se sreće Krukova hijalina promena, koja je posledica hiperkortizolemije. Ona predstavlja koncentričnu akumulaciju intermedijarnih filamenata u citoplazmi. Krukova hijalina promena dolazi do izražaja imunohistohemijskim bojenjem na CK8. Imunohistohemijski, bazofilni adenomi pokazuju intenzivnu ACTH i CK8 imunopozitivnost, dok je ona varijabilnog intenziteta i ekstenziteta kod hromofobnih adenoma. Tumorske ćelije su negativne na ostale hormonske markere adenohipofize (5, 21, 23).

Vrlo retku varijantu ACTH produkujućeg adenoma predstavlja adenom Krukovih ćelija, koji se, pored ACTH imunopozitivnosti, karakteriše prominentnom citoplazmatskom akumulacijom keratinskih filamenata (21).

Gonadotropin produkujći adenomi hipofize

Gonadotropin produkujći adenomi hipofize se karakterišu produkcijom gonadotropnih hormona, FSH i/ili LH. Oni predstavljaju većinu klinički nefunkcionalnih adenoma hipofize (11, 12). Ove adenome odlikuje izražena varijabilnost u histološkoj slici. Većina gonadotropnih adenoma su sinusoidalnog tipa rasta, građeni od izduženih hromofobnih polarizovanih ćelija jasnih granica, sa karakterističnim perivaskularnim pseudorozetama. Nešto ređe se sreće papilarni tip rasta kod gonadotropnih adenoma. Difuzni tip rasta je najređi, i kod njega se sreću okruglaste (nepolarizovane) ćelije. Ovakve ćelije vrlo retko mogu imati acidofilnu citoplazmu, kada ih nazivamo onkocitima. Onkocitna promena se neretko fokalno sreće kod gonadotropnih adenoma. Međutim, ukoliko dominira histološkom slikom, tumor dobija naziv onkocitom. Varijabilnost je podjednako prisutna i u imunohistohemijskom profilu gonadotropnih adenoma. Ovi adenomi znatno češće pokazuju FSH nego LH imunopozitivnost. Obe imunopozitivnosti se češće sreću fokalno nego difuzno, naročito LH. Gonadotropni adenomi su takođe pozitivni na imunohistohemijsko bojenje na Chromogranin A, Synaptophysin i steroidogeni transkripcioni faktor (SF-1) (5, 21, 23).

„Null-cell“ adenomi hipofize

„Null-cell“ adenomi hipofize spadaju u retke neoplazme. Karakteriše ih odsustvo imunohistohemijskog bojenja na sve hormone adenohipofize, kao i na transkripcione faktore (25). Histološki, ovi tumori su najčešće hromofobni, sa različitim stepenom acidofilije. Pokazuju difuzni, sinusoidalni i papilarni tip rasta. Građeni su od okruglastih i poligonalnih ćelija jasnih granica koje često formiraju perivaskularne pseudorozete. Nuklearni pleomorfizam se ne uočava (5, 25).

Plurihormonalni adenomi

Definicija plurihormonalnih adenoma se zasniva na specifičnoj imunoreaktivnosti na hormone koji nisu porekla iste linije diferencijacije (SF-1, Pit-1 i T-pit), a koja nije uzrokovana nespecifičnom ukrštenom reakcijom između antitela. Najčešće kombinacije hormonskih markera su FSH, GH i TSH, kao i PRL i TSH. Retko se sreće kombinacija ACTH, LH, GH i PRL. Pojedinačne razbacane ćelije koje su pozitivne na navedene markere ne bi trebalo uzimati u obzir prilikom postavljanja dijagnoze, budući da se radi o zarobljenim ćelijama adenohipofize, nego o ćelijama plurihormonalnog adenoma (5, 23).

Atipični adenomi

Atipični adenomi su, prema kriteijumima SZO, definisani kao adenomi koji pokazuju difuznu p53 imunopozitivnost, proliferativni indeks veći od 3% i povećanu mitotsku aktivnost (5). Predstavljaju oko 15% adenoma hipofize u hirurškim serijama, a nešto se češće sreću kod funkcionalnih adenoma (26, 27). Međutim, u klasifikaciji adenoma hipofize koju je Trouillas predložila 2012. godine atipični adenomi nisu navedeni, već se adenomi klasifikuju u tri gradusa, pri čemu gradus 2 najviše odgovara atipičnim adenomima.

1.2.4. Kliničke karakteristike adenoma hipofize

Adenomi hipofize koji kod pacijenata dovode do pojave simptoma i znakova koji su uzrokovani (hiper)sekrecijom hormona nazivaju se funkcionalni adenomi. Međutim, postoji spektar promena koje su zajedničke za sve makroadenome, a koje su uzrokovane efektom mase, kompresijom okolnih struktura, kao i njihovom infiltracijom. U njih spadaju glavobolja, smanjenje ili potpuni gubitak funkcije adenohipofize i neurohipofize, suženje vidnog polja, poremećaj oštine vida i lakostepena hiperprolaktinemija (kao posledica kompresije stalka hipofize). Suženje vidnog polja je prouzrokovano kompresijom na optičku hijazmu, koje obično progredira od superiorne lateralne kvadrantanopije, preko bilateralne hemianopsije do eventualnog slepila. Za razliku od relativno lako uočljivih promena u kvalitetu vida, simptomi hipopituitarizma su podmukli, a samim tim zahtevniji za prepoznavanje od strane ne samo pacijenata, već i od strane lekara koji se ne bave endokrinologijom. Insipidni dijabetes se retko javlja kao posledica rasta tumora. Adenomi relativno često invadiraju okolne strukture: inferiorno sfenoidalni sinus, lateralno kavernoze sinuse (dovodeći do oftalmoplegije) i ređe, superiorno, moždani parenhim (5). Invazivnost tumora, kako makroskopska, tako i histološka predstavlja jedan od kriterijuma savremene, kliničko-patološke klasifikacije adenoma hipofize (13).

Hormon rasta produkujući adenomi hipofize, kao posledicu hipersekrecije hormona rasta, prouzrokuju akromegaliju, odnosno gigantizam, u zavisnosti od uzrasta pacijenta u momentu početka bolesti. Početak bolesti pre puberteta prouzrokuje neprestani rast (gigantizam), dok početak bolesti posle puberteta prouzrokuje rast akralnih delova tela (akromegaliju). Hormon rasta svoje efekte u perifernim tkivima postiže putem insulin-sličnog faktora rasta 1 (eng. Insulin-like growth factor 1 – IGF-1), koji dovodi do rasta mekih tkiva i kostiju. Grube crte lica, praćene uvećanim nosom, debelim usnama i naglašenim nazolabijalnim brazdama su lako uočljivi. Rast kostiju se najlakše uočava kroz rast donje vilice, povećanje interdentalnih razmaka i prognaciju. Rast paranazalnih sinusa dovodi do stvaranja frontalnog ispupčenja. Koža je zadebljana, orošena znojem. Uvećanje jezika i uvule su uzrok apneje tokom spavanja (eng. Sleeping apnea). Kompresivna neuropatija se sreće kod 20-30% pacijenata i obično je tarzalna i karpalna. Organomegalija

je većinom asimptomatska, izuzev hipertrofije leve komore koja je uzrok kardiomiopatije i životno-ugrožavajućih aritmija. Značajan procenat pacijenata boluje i od dijabetes melitusa. Prekomeran rast hrskavice dovodi do periferne artropatije kod više od 70% pacijenata (28). HR produkujući adenomi se tretiraju ili hirurški, ili analogima somatostatina, dok se samo u posebnim slučajevima (nakon ponavljanih hirurških intervencija i/ili višestruke farmakorezistencije) sprovodi zračna terapija (29). Značajan je podatak da slabo granulirani HR produkujući adenomi pokazuju nešto drugačiju kliničku prezentaciju: javljaju se češće kod mlađih osoba, nešto češće kod muškog pola, agresivnijeg su biološkog ponašanja i neretko rezistentni na terapiju analogima somatostatina (20). Klinički nemi HR produkujući adenomi spadaju u raritete (30).

Prolaktinomi se manifestuju hiperprolaktinemijom (većom od reda veličine preseka stalka), čiji se simptomi razlikuju u zavisnosti od uzrasta i pola pacijenta. U generativnom periodu kod žena hiperprolaktinemija uzrokuje amenoreju i galaktoreju, dok kod muškaraca je uzrok smanjenja libida, impotencije i abnormalnosti spermograma (31). Prolaktinomi kod žena u postmenopauzalnom periodu su retki, pri čemu vrlo retko prouzrokuju galaktoreju, a češće se manifestuju tegobama karakterističnim za nefunkcionalne adenome, kao što su glavobolja, ispadi u vidnom polju i duple slike, a nekada se otkrivaju kao incidentalomi (32).

TSH produkujući adenomi dovode do hipersekrecije TSH, što se manifestuje hipertireoidizmom i strumom. Klinički se ovi retki pacijenti ne razlikuju po pitanju simptoma od obolelih od Grejvsove bolesti. Ovi adenomi često imaju agresivan rast i invazivni su. Retki klinički nemi TSH produkujući adenomi se takođe karakterišu agresivnijim rastom (24).

Hiperprodukcija ACTH uzrokovana ACTH produkujućim adenomom nosi naziv Kušingova bolest. Kao rezultat hipersekrecije ACTH postoji hiperkorticizam, čije kliničke posledice su centripetalna distribucija masnog tkiva (abdomen, facies lunata, „buffalo hump“, supraklavikularne jame) i proksimalna mišićna slabost. Katabolički efekti kortizola dovode do istanjenja kože, sklonosti ka stvaranju modrica i ljubičastih strija. Osteoporoza

uzrokovana steroidima se često javlja, a naročito je izražena na kičmenim pršljenovima. Hiperkortizolemija za posledicu ima insulinsku rezistenciju i dijabetes melitus. Imunološka supresija kortizolom predstavlja osnovu za brojne infekcije. Efekti hiperkortizolemije na CNS se ogledaju u depresiji, nesanicu, emocionalnoj labilnosti i oslabljenoj memoriji. ACTH produkujući adenomi su u oko 80% slučajeva mikroadenomi. Makroadenomi se sreću u 5% slučajeva. U preostalih 15% slučajeva vizualizacionim metodama se ne otkriva jasna lezija (mikroadenomi čije su dimenzije ispod praga detekcije). Terapija izbora ovih pacijenata je radikalna hirurška ekscizija adenoma (28, 33).

Gonadotropin produkujući adenomi pokazuju visok stepen varijabiliteta u kliničkoj slici. Njihov dijapazon se kreće od malih slučajno otkrivenih lezija (incidentalomi) do velikih kompresivnih i invazivnih lezija. Većinom su hormonski inaktivni makroadenomi koji invadiraju okolne strukture. Vrlo često su uzrok hipopituitarizma (61%), glavobolje (36%) i poremećaja vidnog polja (72%). Prezentacija pacijenta apopleksijom tumora (akutna epizoda hemoragične nekroze tumora) je najčešća kod ove vrste adenoma hipofize (11, 12).

Klinička slika „null-cell“ adenoma hipofize isključivo zavisi od kompresivnih efekata tumora, budući da ovi tumori ne produkuju, a samim tim i ne sekretuju hormone. Hiperprolaktinemija koja se nekad sreće kod ovih adenoma je reda veličine preseka stalka (11, 25).

Klinička slika plurihormonalnih adenoma je vrlo varijabilna i zavisi od kombinacije hormona koju ovi adenomi produkuju i/ili sekretuju. Hiperprolaktinemija reda veličine preseka stalka se često sreće (18).

1.3. ĆELIJSKI CIKLUS – OPŠTE KARAKTERISTIKE

Ćelijski ciklus je proces kojim se ćelije dele na kćerke ćelije. Tradicionalno se deli na 4 faze: G1 (faza pripreme za sintezu DNK), S (faza sinteze DNK), G2 fazu (faza pripreme za deobu ćelije) i M (faza deobe ćelije). Mnogi autori fazu mirovanja, ili G0 fazu takođe smatraju fazom ćelijskog ciklusa. Na prelazu jedne faze u drugu se nalaze tzv. kontrolne tačke, čija je funkcija provera kvaliteta i integriteta genoma. Regulacija kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, naročito regulacija G1/S kontrolne tačke, se dovodi u vezu sa poreklom/genezom tumora hipofize (34). Progresija kroz ćelijski ciklus je regulisana pomoću ciklin zavisnih kinaza (CZK). Aktivnost CZK je uslovljena fluktuacijama u intracelularoj koncentraciji njihovih aktivatora (ciklina) ili inhibitora (inhibitor ciklin zavisnih kinaza, ICZK) (35).

1.3.1. Uloga p16 u regulaciji ćelijskog ciklusa

Protein p16 su prvi put opisali Serrano i saradnici 1993. godine. Kodiran je genom CDKN2A koji je lociran na hromozomu broj 9. P16 pripada ICZK familiji INK4, zajedno sa p15^{INK4b}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d}. Inhibira prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, inaktivirajući kompleks CZK4 i CZK6 sa ciklinom D, koji dalje održava RB protein u aktivnoj, hipofosforilisanom formi. Hipofosforilisani E2F inhibira transkripcioni faktor E2F, koji je neophodan za prelazak G1 u S fazu (36). Samim tim, p16 funkcioniše kao tumor supresor. Redukovana ekspresija p16 dovodi do povećane proliferacije. Delecija, hipermetilacija ili mutacija gena CDKN2A za posledicu ima deregulaciju ćelijskog ciklusa i kancerogenezu (37). Sa druge strane, konstantna aktivacija p16 (najčešće usled oštećenja DNK) dovodi do permanentnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa i senescencije (37-39).

RB1 inhibicioni put, kojeg sačinjavaju p15^{INK4b}-p16^{INK4a}-ciklinD/CZK4-RB1 je poremećen kod adenoma hipofize i najverovatnije predstavlja jedan od preduslova za tumorigenezu (40, 41).

Detekcija p16 proteina se sprovodi i imunohistohemijski, aplikacijom brojnih mono i poliklonalnih antitela, pri čemu interpretacija rezultata nije uniformna i zavisi od klona primenjenog antitela (42).

1.3.2. Uloga p21 u regulaciji ćelijskog ciklusa

P21(eng. Cyclin dependent kinase interacting protein - CIP1; Wild type p53 activated faktor - WAF1) je prvi otkriveni ICZK. Otkrili su ga el-Deiry i saradnici 1993. godine, kada su prepoznali i da je glavni regulator ekspresije p21 protein p53 (43). Funkcija p21 zavisi od njegove lokalizacije u ćeliji; on ima različite uloge u jedru i citoplazmi (44).

Glavna uloga p21 u jedru je zaustavljanje ćelijskog ciklusa nakon detektovanog oštećenja DNK. P21 inhibira aktivnost CZK1, CZK2 i kompleksa CZK4/6, onemogućavajući prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Smatra se da je p21 jedan od najbitnijih regulatora odgovora ćelije na genotoksični stres (UV i jonizujuće zračenje, hemijski mutageni, citostatici) (44). P21 takođe ima uticaja na prelazak iz G2 u M fazu ćelijskog ciklusa, tako što inhibira kompleks CZK1 i ciklina B (45). Nuklearna ekspresija p21 ima bitnu ulogu u procesu senescencije, ireverzibilnog ulaska ćelije u G0 fazu ćelijskog ciklusa, bez mogućnosti reaktivacije. Uloga p21 u senescenciji je naročito naglašena kada je senescencija prouzrokovana oštećenjima DNK (46).

Lokalizovan u citoplazmi, p21 ima ulogu u inhibiciji apoptoze, povećanju motiliteta ćelije, a samim tim i invazivnosti i agresivnosti tumora (47-49).

Detekcija i lokalizacija p21 proteina se u današnje vreme uspešno vrši imunohistohemijski, primenom monoklonalnih antitela.

1.3.3. Uloga p53 u regulaciji ćelijskog ciklusa

Protein p53 je produkt tumor supresornog gena TP53. Njegova glavna uloga je zaustavljanje ćelijskog ciklusa, kao i indukcija apoptoze. P53 je neophodan za prelazak ćelije iz G1 u S fazu, gde većinom deluje kao transkripcioni faktor p21. Takođe je glavna komponenta G2/M prelazne tačke ćelijskog ciklusa. Nivo p53 je regulisan povratnom spregom, pomoću MDM2 molekula, koji vrši njegovu razgradnju. Na aktivaciju i povećanje koncentracije p53 proteina u ćeliji utiču mnogi faktori, kao što su oštećenje DNK, aktivacija onkogena i skraćenje telomera (50). P53 ima uticaj u ograničavanju proliferativnog kapaciteta ćelija, odnosno u aktivaciji senescencije (51). Imunohistohemijska detekcija p53 je u današnje vreme rutinska praksa, i ima kako dijagnostički tako i prognostički značaj kod brojnih tumora (52).

1.3.4. Ki-67 i ćelijski ciklus

Protein Ki-67 je primarno bio definisan kao prototip monoklalnog mišijeg antitela sintetisanog nakon imunizacije životinja jedrima ćelija Hodgkinovog limfoma koja pripadaju ćelijskoj liniji L428. Naziv proteina potiče od imena grada u kome je prvi put sintetisan (Kiel) i broja klona. Budući da antigen na kojeg je generisano antitelo nije inicijalno jasno definisan, imenovan je kao Ki-67 antigen. Međutim, kada je struktura proteina – antigena bila prepoznata na osnovu cDNK, ona nije odgovarala ni jednom poznatom proteinu, te je zato zadržan naziv proteina Ki-67 (53). Ki-67 je marker proliferacije kako netumorskih, tako i tumorskih ćelija. Tokom interfaze, Ki-67 se detektuje u jedru, dok je tokom mitoze translociran na površinu hromozoma. Ki-67 se detektuje u svim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i M), izuzev u senescentnoj, G0 fazi (53). Iako tačna funkcija proteina Ki-67 u ćelijskom ciklusu još nije prepoznata, nesumnjivo je da su ekspresija proteina Ki-67 i ćelijski ciklus neraskidivo povezani. Sa druge strane, još nije prepoznat protein koji sa takvom preciznošću detektuje ćelije koje se nalaze van G0 faze ćelijskog ciklusa. Smatra se da varijacije u intenzitetu imunohistohemijskog bojenja zavise od podfaze ćelijskog ciklusa u kojoj se ćelija nalazi (53).

Imunohistohemijsko bojenje Ki-67 ima široku primenu u patologiji u svakodnevnoj praksi. Klon Ki-67 MIB-1 je postao neizostavan kako dijagnostički, tako i prognostički marker (13).

1.4. Senescencija i ćelijski ciklus

Senescencija predstavlja ireverzibilni zastoj ćelijskog ciklusa u G0 fazi, bez mogućnosti sinteze DNK nakon mitogenih stimulusa, koji nastaje kao posledica skraćanja telomera ili onkogenog stresa (54). Ireverzibilnost senescencije podstiče na pretpostavku da bi senescencija mogla biti jedan od faktora koji suprimiraju rast tumora i njihovu malignu alteraciju (55). Senescencija je prvi put opisana u kulturi humanih fibroblasta, kada je Hayflick primetio da ćelije nakon određenog broja deoba prestaju da se dele (Hayflick-ov fenomen) (56). Ovaj tip senescencije je kasnije nazvan replikativna senescencija, budući da je povezana sa brojem deoba i progresivnim skraćivanjem dužine telomera. Senescencija može biti pokrenuta i aktivacijom onkogeno, koja za posledicu ima aktivaciju izvesnog broja antionkogeno, koji su zaduženi za nastanak i održavanje ireverzibilnog boravka ćelije u G0 fazi. Najznačajniji markeri onkogenima indukovane senescencije (OIS) su zapravo markeri dva glavna tumor-supresorna puta, a koji su istovremeno uključeni u regulaciju ključnih tranzicionih tačaka ćelijskog ciklusa: p53/p21 i pRb/p16 (39, 46, 57-60).

Budući da je senescencija multifaktorijalan proces, koji se može razlikovati u zavisnosti od vrste tkiva i ćelija koje se analiziraju, a takođe može pokazivati i varijabilnost između vrsta, javila se potreba za identifikacijom većeg broja markera (54). Dimri i saradnici su 1995. godine patentirali danas široko primenjeno histohemijsko bojenje na β -galaktozidazu (61), koje je markiralo senescentne ćelije. β -galaktozidaza je lizosomalni enzim koji se fiziološki eksprimira u malom obimu u svim tkivima i organima, a do njegovog nakupljanja dolazi tokom procesa senescencije, kada se naziva sa senescencijom udružena β -galaktozidaza (engl. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -GAL)) (62, 63). Kako je za histohemijsko bojenje na SA- β -GAL neophodno sveže tkivo, mogućnosti aplikacije ovog markera su ograničene na relativno mali broj uzoraka. U cilju rešavanja ovog problema, u skorije vreme proizvedena su antitela za imunohistohemijsko bojenje

ovog enzima na tkivu fiksiranom u formalinu i ukalupljenom u parafinskim kalupima. Na ovaj način je omogućeno ispitivanje SA- β -GAL u velikim serijama, budući da parafinski kalupi predstavljaju decenijama rutinski način čuvanja tkiva.

1.5. Tkivni mikro niz

Tkivni mikro niz (TMN) predstavlja kolekciju više različitih tkivnih uzoraka u jednom parafinskom kalupu. TMN se konstruiše tako što se iz idealnih zona tkiva parafinskih kalupa donora instrumentom izdvajaju tkivni cilindri, koji se pohranjuju u kalup recipijent, odnosno budući TMN. Ova tehnika omogućava brzu i jeftinu analizu velikog broja uzoraka parafinskih kalupa pomoću histohemije, imunohistohemije, in situ hibridizacije i fluorescentne in situ hibridizacije, pri čemu se količina tkiva kalupa donora značajno ne troši (64, 65).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Ciljevi istraživanja su:

1. Ispitivanje ekspresije p16 i p21 u svim podtipovima adenoma hipofize
2. Poređenje ekspresije p16 i p21 u adenomima sa ekspresijom u adenohipofizi
3. Poređenje ekspresije p16 i p21 grupe recidivantnih sa grupom nerekidivantnih adenoma
4. Ispitivanje korelacije ekspresije p16 i p21 sa kliničkim podacima pacijenata (pol, uzrast, indeks telesne mase, veličina tumora, invazivnost tumora)
5. Ispitivanje korelacije ekspresije p16 i p21 sa ekspresijom p53 i Ki-67 u adenomima hipofize

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je dizajnirano kao studija preseka.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj saglasnosti 29/XII-15, izdata dana 01.12.2014.), a sprovedeno je u skladu sa normativima Helsinške deklaracije.

3.1. Mesto i period istraživanja

U cilju formiranja eksperimentalne grupe, iz Kabineta za neuropatologiju (na Neurohirurškoj klinici), Službe za patologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu su izdvojeni parafinski kalupi na čijim presecima su dijagnostikovani adenomi hipofize u periodu od 2002-2011. godine. U cilju formiranja biopsijske kontrolne grupe, iz gore pomenute institucije su izdvojeni i kalupi na kojima se pored adenoma nalazilo i tkivo adenohipofize. Za potrebe formiranja autopsijske kontrolne grupe sakupljane su adenohipofize autopsijskih slučajeva Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u čijim uputnim listama nije navedeno endokrinološko oboljenje. Konstrukcija TMN, fotografisanje preseka TMN i softverske analize su obavljene na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, gde je urađen i najveći deo imunohistohemijskih bojenja. Deo imunohistohemijskih bojenja je urađen u Science for Life Laboratory, Uppsala University, Rudbeck laboratory, Uppsala, Švedska. Statistička analiza podataka je urađena na Institutu za medicinsku statistiku Medicinskog fakulteta u Beogradu.

3.2. Selekcija ispitanika

Eksperimentalna grupa: Istraživanje je sprovedeno na tkivu adenoma hipofize u parafinskim kalupima pacijenata koji su u periodu od 01.01.2002. do 31.12.2011. operisani na Neurohirurškoj klinici Kliničkog Centra Srbije u Beogradu. Kriterijum za izbor pacijenata koji su uključeni u ispitivanje je bila površina preseka tkiva adenoma hipofize u parafinskom kalupu veća od 6mm². Od tkiva adenoma hipofize ovih pacijenata je konstruisan TMN. Budući da tokom izrade TMN može doći do osipanja i trošenja tkiva, u

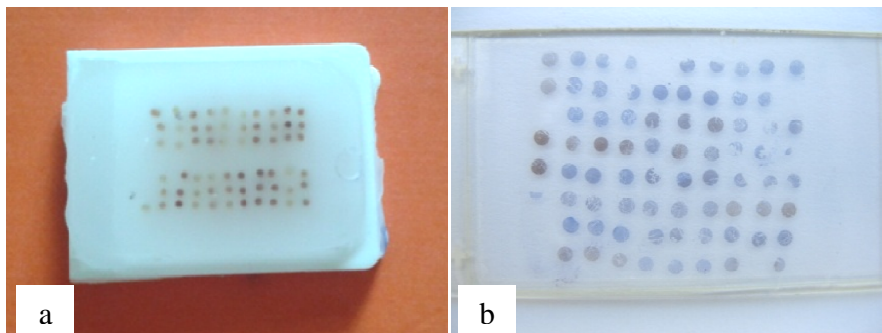
istraživanje su uključeni oni pacijenti kod kojih je na svim presecima TMN bio prisutan minimalno jedan cilindar tkiva.

Kontrolna grupa: Formirane su dve kontrolne grupe. Prva kontrolna grupa (nazvana biopsijska) je sačinjena od pacijenata koji su hirurški tretirani zbog adenoma hipofize na Neurohirurškoj klinici Kliničkog centra Srbije u Beogradu, u periodu od 2012-2014 godine, a u čijim parafinskim kalupima se, pored tkiva adenoma, nalazilo i akcidentalno hirurški ekscidirano tkivo adenohipofize. Od uzoraka ovih adenohipofiza takođe je formiran TMN.

Druga kontrolna grupa (nazvana autopsijska) je formirana od obdukcionijskih slučajeva Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu tokom 2012-2014. godine, a u čijoj uputnoj listi za autopsiju nije navedeno postojanje endokrinološkog oboljenja, i kod kojih u tkivu hipofize nisu uočene patološke promene. Sva tela su se čuvala na temperaturi između 4°C i 8°C od momenta dopremanja na Institut za patologiju do momenta početka obdukcije. Od uzoraka ovih adenohipofiza takođe je formiran TMN.

3.3. Instrumenti merenja

Konstrukcija TMN: Tkivo iz selektovanih parafinskih kalupa adenoma hipofize i kalupa adenohipofize (kalupi donori) je iskorišćeno za konstrukciju TMN (66). Preparati obojeni standardnom hematoksilin-eozin (H&E) metodom, napravljeni sa preseka kalupa donora su ponovo pregledani. Idealne zone adenoma hipofize su prepoznate i obeležene na H&E preparatima, a zatim su te zone obeležene i na kalupima donorima. U kalup recipijent (tj. TMN) su manuelno konstruisanim instrumentom (igle prečnika 1.2mm) preneti po 3 cilindra iz svakog kalupa donora, kao i cilindri tkiva spoljašnjih pozitivnih kontrola, u skladu sa korišćenim antitelima (Slika 2). Na osnovu činjenice da jedan cilindar ima površinu od 1.13mm², a da su iz svakog kalupa donora uzeta po tri cilindra, došli smo do definicije gore opisanog inkluzionog kriterijuma za eksperimentalnu grupu. Naime, do kriterijuma površine tkiva adenoma hipofize u kalupu donoru od 6mm² smo došli sa ciljem da u svakom kalupu donoru ostavimo minimalno polovinu dostupnog tkiva za potencijalne analize u budućnosti.



Slika 2: Tkiwni mikro niz, (a) makroskopski izgled kalupa recipijenta; (b) makroskopski izgled preparata TMN nakon imunohistohemijskog bojenja.

Imunohistohemijsko bojenje: Sa svakog TMN kalupa su isečeni preseći debljine 5 μ m. Manuelno su vršena bojenja na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledećim antitelima: Citokeratin 8 (Leica Biosystems, clone TS1, 1:50), HR (DAKO, polyclonal, 1:400), PRL (DAKO, polyclonal, 1:300), FSH (Immunotech, polyclonal, 1:3000), LH (DAKO, clone C93, 1:50), TSH (DAKO, clone 0042, 1:50), ACTH (DAKO, clone 02A3, 1:100), Ki-67 (DAKO, Clone MIB-1, 1:50), p53 (Thermo Scientific, clone DO7, 1:50), p16 (Santa Cruz, Clone F-12, 1:300) i p21 (DAKO, Clone CX-118, 1:50). Bojenje je vršeno tako što je nakon deparafinizacije i antigenskog demaskiranja (u skladu sa uputstvima proizvođača svakog antitela ponaosob) vršena inkubacija preseka primarnim antitelom u trajanju od 15 minuta do 12h, u zavisnosti od uputstava proizvođača. Za spoljašnje pozitivne kontrole je korišćeno tkivo visokogradusne intraepitelne lezije cerviksa uterusa za p16, p21, p53 i Ki-67, epitel kolona za bojenje na SA- β -GAL, a za hormone i transkripcione faktore adenohipofize tkivo adenohipofize. Vizualizacija pozitivnog bojenja se zasnivala na primeni streptavidin-biotin tehnike (DAKO LSAB+ kit), a kao hromogen je korišćen 3-3' diaminobenzidin (DAB).

U ovom istraživanju je po prvi put korišćeno novo, poliklonalno, purifikovano antitelo na SA- β -GAL HPA0069503 (koncentracija 0.307 mg/ml; 1:1000), koje je proizvedeno i čiji je kvalitet verifikovan u sklopu projekta Human Protein Atlas (67). Ovo bojenje, kao i imunohistohemijska bojenja na steroidni faktor rasta 1 (SF-1) (Invitrogen,

clone N1665, 1:200) i za hipofizu specifični pozitivni transkripcioni faktor (eng. Pituitary-specific positive transcription factor 1 - PIT1) (Novus Biologicals, polyclonal, 1:500) su vršena u Uppsali, Švedska, automatski, upotrebom DAKO automatskog stejnara (65).

Analiza imunohistohemijski obojenih preseka tkiva: Preseci svakog cilindra TMN su fotografisani pomoću kamere Olympus DP70 na uveličanju x100.

Određivanje podtipa adenoma hipofize na osnovu hormonskih imunohistohemijskih analiza je sprovedeno manuelno, od strane patologa na osnovu kriterijuma SZO (5).

Brojanje pozitivnih i negativnih p53, Ki-67, p16 i p21 jedara je urađeno softverski, upotrebom programa Image J, na fotografijama imunohistohemijski obojenih preseka TMA, nakon čega je izračunat procenat pozitivnih jedara na celom uzorku.

Procena citoplazmatske pozitivnosti p21 je urađena manuelno, uvođenjem citoplazmatskog skora bojenja (CSB). CSB se izračunava množenjem skora intenziteta (SI) i skora ekstenziteta (SE). SI dobija vrednost 1 kada je bojenje fokalno, a vrednost 2 kada je bojenje difuzno. SE dobija vrednost 0 kada je bojenje negativno, vrednost 1 za lakostepeno bojenje, vrednost 2 za bojenje umerenog intenziteta i vrednost 3 za intenzivno bojenje. Vrednost CSB može biti od 0 do 6 (68).

Procena citoplazmatske pozitivnosti imunohistohemijskog bojenja na SA- β -GAL je vršena tako što je procenjivan samo intenzitet bojenja, budući da su bojenja na svim uzorcima unutar eksperimentalne i kontrolnih grupa bila difuzna. Intenzitet bojenja je gradiran kao negativan, lakostepen, umeren i intenzivan.

Sakupljanje kliničkih podataka: Klinički podaci su sakupljeni iz baze podataka pacijenata Neurohirurške klinike na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.4. Statistička analiza:

U studiji su korišćene deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih su korišćeni apsolutni i relativni brojevi (n,%), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (standardna devijacija i interval varijacije). Od

analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza povezanosti. Od testova za ispitivanje značajnosti razlike, korišćeni su parametarski testovi (t test i ANOVA) i neparametarski testovi (Hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test). Za ispitivanje povezanosti korišćeni su Pirsonova i Spirmanova korelaciona analiza, kao i linearna regresiona analiza. Bonferonijeva korekcija je korišćena u svim slučajevima višestrukih komparacija. Rezultati su prikazani tekstualno, tabelarno i grafički. Svi podaci su obrađeni u SPSS 20.0 (IBM korporacija) softverskom paketu. U svim primenjenim analitičkim metodama nivo statističke značajnosti bio je definisan verovatnoćom nulte hipoteze od 0.05.

4. REZULTATI

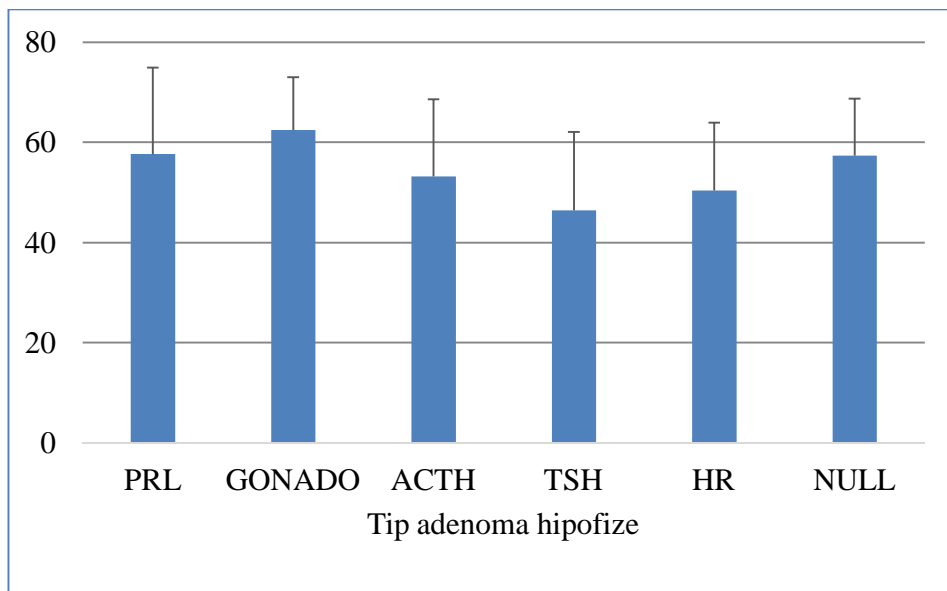
Od 815 pacijenata operisanih u desetogodišnjem periodu, inkluzione kriterijume je ispunilo 345 pacijenata.

4.1. Distribucija pacijenata eksperimentalne grupe po polu i uzrastu

Unutar eksperimentalne grupe 192 pacijenta (55.52%) su bila muškog a 153 (44.48%) ženskog pola. Starost pacijenata u momentu operacije se kretala u rasponu od 14 do 79 godina (srednja vrednost, 51.68 ± 13.59 godina), uz sledeću distribuciju: ≤ 20 godina, $n = 5$; 21–30 godina, $n = 26$; 31–40 godina, $n = 40$; 41–50 godina, $n = 74$; 51–60 godina, $n = 102$; 61–70 godina, $n = 74$; 71–80 godina, $n = 24$. Uočena je statistički značajna razlika u uzrastu između polova ($p = 0.039$; muškarci, srednja vrednost 53.02 ± 13.10 godina; žene, srednja vrednost 49.99 ± 14.06 godina).

Pacijenti sa gonadotropnim adenomima su bili statistički značajno stariji od pacijenata sa ACTH produkujućim adenomima ($p = 0.011$), TSH produkujućim adenomima ($p = 0.012$) i HR produkujućim adenomima ($p \leq 0.001$) (grafikon 1).

Grafikon 1: Uzrast pacijenata sa adenomima hipofize



4.2 Distribucija adenoma hipofize u odnosu na klasifikaciju SZO

Distribucija adenoma hipofize, u odnosu na imunohistochemijsku ekspresiju hormona adenohipofize, a u odnosu na kriterijume SZO (5) je izgledala na sledeći način: 11 prolaktinoma, 23 ACTH produkujućih adenoma, 100 HR produkujuća adenoma, 7 TSH produkujuća adenoma, 185 gonadotropna adenoma i 19 null-cell adenoma. HR produkujći adenomi su podeljeni u podgrupe, u skladu sa SZO kriterijumima: 55 gusto granuliranih (30 koji produkuj samo HR, 10 mešoviti HR-PRL produkujućih i 15 plurihormonalnih HR produkujućih adenoma) i 45 slabo granuliranih (28 koji produkuj samo HR, 14 mešoviti GH-PRL produkujućih i 3 plurihormonalna HR produkujuća adenoma) (tabela 1).

Tabela 1: Broj adenoma hipofize unutar tipova i podtipova

Grupe i podgrupe adenoma hipofize	Broj adenoma hipofize
GH	100 (28.77%)
SG-GH	45
GG-GH	55
PRL	11 (3.2%)
GONADO	185 (53.77%)
ACTH	23 (6.68%)
TSH	7 (2.03%)
NULL	19 (5.52%)
Ukupno	345

4.3 Distribucija pacijenata kontrolnih grupa po polu i uzrastu

4.3.1 Biopsijska kontrolna grupa

Biopsijsku kontrolnu grupu je sačinjavalo 18 pacijenata, od kojih su 4 bila muškog (22.2 %) a 14 ženskog pola (77.8 %). Uzrast analiziranih pacijenata se kretao između 20 i 70 godina (prosečna vrednost, 46.56 ± 14.31 godina); sa sledećom distribucijom: ≤ 20 godina, n = 1; 21–30 godina, n = 0; 31–40 godina, n = 8; 41–50 godina, n = 1; 51–60 godina, n = 4; 61–70 godina, n = 4. Nije uočena statistički značajna razlika u starosti

između polova (muškarci, srednja vrednost 51.5 ± 1.1 godina; žene, srednja vrednost 48.37 ± 14.42 godina)

Tipovi adenoma hipofize, koji su se nalazili pored akcidentalno ekscidiranog tkiva adenohipofize, bili su: HR produkujući, 10; gonadotropni, 5; ACTH produkujući, 2; TSH produkujući, 1; PRL produkujući, 1.

4.3.2 Autopsijska kontrolna grupa

Autopsijsku kontrolnu grupu je sačinjavalo 60 slučajeva, 26 muškog (43.3%) i 34 ženskog pola (56.7%). Starost ovih ispitanika se kretala između 29 i 90 godina (prosečna vrednost 65.45 ± 13.56 godina). Distribucija uzrasta po dekadama je izgledala na sledeći način: 21–30 godina, n = 1; 31–40 godina, n = 1; 41–50 godina, n = 5; 51–60 godina, n = 11; 61–70 godina, n = 17; 71–80 godina, n = 19; 81–90 godina, n = 6. Nije uočena statistički značajna razlika u starosti u odnosu na pol (muškarci, srednja vrednost 63.46 ± 13.32 godina; žene, srednja vrednost 66.97 ± 13.75 godina). Postmortalni interval (PMI) je određivan na osnovu vremena smrti koje je navedeno u uputnici za autopsiju. PMI se kretao od 6 do 96 sati, uz sledeću distribuciju: <12 sati, 10; 13–24 sati, 26; 25–48 sati, 16; 49–72 sati, 6 i 73–96 sati: 2.

Prosečne vrednosti starosti pacijenata unutar kontrolnih grupa i eksperimentalne grupe su prikazani u tabeli 2.

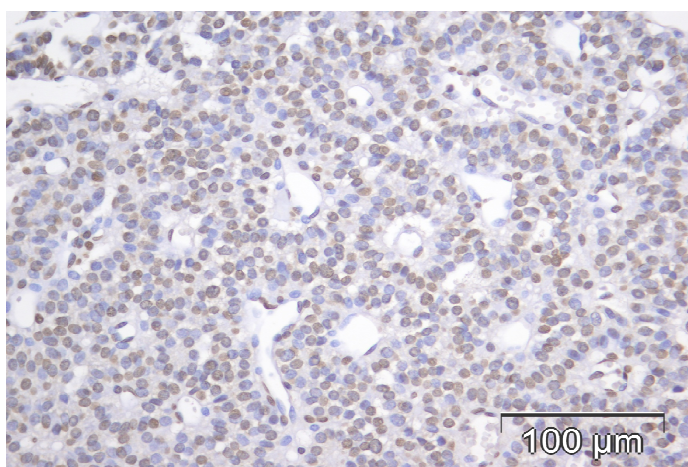
Tabela 2: Starost pacijenata unutar kontrolnih grupa i eksperimentalne grupe

Naziv grupe	Srednja vrednost	SD	Min	Max
Kontrolna biopsija	47.21	14.19	20	70
Kontrolna autopsija	65.45	13.56	29	90
Eksperimentalna	51.68	13.59	14	79

Statistički značajna razlika po pitanju starosti je uočena između kontrolne autopsijske i eksperimentalne grupe ($p = 0.000$), kao i između dve kontrolne grupe ($p = 0.000$), dok između eksperimentalne i kontrolne biopsijske grupe nije uočena.

4.4 Ekspresija p16 u adenomima hipofize

Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti nuklearne imunohistohemijske ekspresije p16 u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize, kao i u tipovima adenoma hipofize (slika 3) su prikazane u tabelama 3 i 4, kao i na grafikonu 2.



Slika 3: p16 imunohistohemijska nuklearna ekspresija u null-cell adenomu (uvećanje 400x)

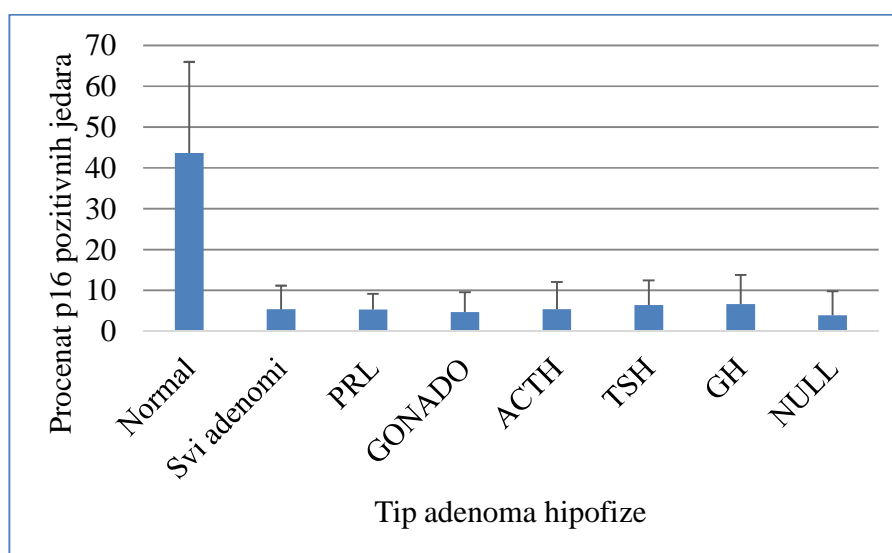
Tabela 3: Srednje vrednosti, standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti procenta p16 pozitivnih jedara u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize

Grupa	Srednja vrednost	SD	Min	Max
Eksperimentalna p16 (%)	5.30	5.84	0.03	35.61

Tabela 4: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti procenata p16 pozitivnih jedara u tipovima adenoma hipofize

Tip adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
PRL	5.25	3.90	6.19	0.25	9.86
HR	6.64	7.12	4.39	0.10	35.60
GONADO	4.64	4.86	3.07	0.03	31.59
ACTH	5.39	6.62	4.10	0.10	31.02
TSH	6.37	6.04	5.95	0.59	14.85
Null	3.91	5.85	2.61	0.35	25.45

Grafikon 2: Srednje vrednosti p16 pozitivnih jedara sa standardnom devijacijom u normalnoj adenohipofizi, svim adenomima i tipovima adenoma hipofize

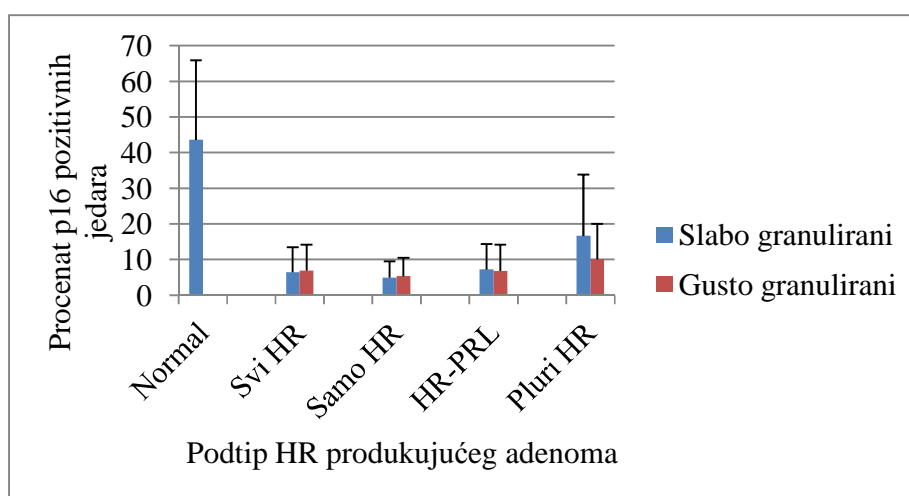


Statistički značajne razlike nisu uočene po pitanju procenata p16 pozitivnih jedara između tipova adenoma hipofize, kao ni između podtipova HR produkujućih adenoma (tabela 5, grafikon 3).

Tabela 5: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti procenata p16 pozitivnih jedara u podtipovima HR produkujućih adenoma hipofize

Podtip HR produkujućeg adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
SG-svi HR	6.47	7.08	4.36	0.10	35.61
GG-svi HR	6.92	7.31	4.60	0.21	27.45
SG-samoHR	4.99	4.55	3.86	0.10	17.61
GG-samoHR	5.36	5.19	3.79	0.21	21.66
SG-HR-PRL	7.23	7.16	5.15	0.61	24.92
GG-HR-PRL	6.82	7.39	3.73	0.21	18.78
SG-Pluri-HR	16.64	17.30	12.58	1.74	35.61
GG-Pluri-HR	10.10	9.95	6.15	0.22	27.45

Grafikon 3: Procenat p16 pozitivnih jedara sa standardnom devijacijom u normalnoj adenohipofizi i podtipovima HR produkujućih adenoma



4.5 Nuklearna p21 ekspresija u adenomima hipofize

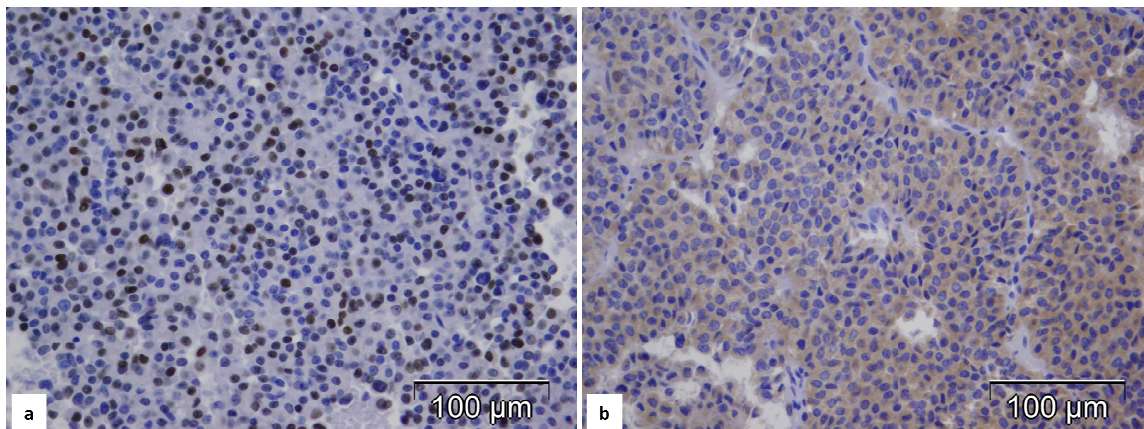
Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti nuklearne imunohistohemijske ekspresije p21 (Slika 4a) u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize, kao i u tipovima adenoma su prikazane u tabelama 6 i 7.

Tabela 6: Srednja vrednost, standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti procenta p21 pozitivnih jedara u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize

Grupa	Srednja vrednost	SD	Min	Max
Eksperimentalna p21 nuklearno (%)	1.68	3.25	0.01	23.80

Tabela 7: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti nuklearne imunohistohemijske ekspresije p21 u tipovima adenoma hipofize

Tip adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
PRL	2.31	4.80	0.78	0.06	16.52
HR	3.21	4.71	1.77	0.04	23.80
GONADO	1.16	2.49	0.30	0.00	19.02
ACTH	2.81	7.95	0.59	0.02	38.68
TSH	0.78	0.73	0.48	0.04	2.16
Null	1.03	1.18	0.38	0.05	3.62



Slika 4: p21 imunohistohemijska pozitivnost, (a) nuklearna, u SG-HR produkujućem adenomu, (b) citoplazmatska, u null-cell adenomu (uvećanje 400x)

HR produkujući adenomi su pokazali najvišu vrednost p21 pozitivnih jedara u odnosu na sve druge tipove adenoma, pri čemu je statistička značajnost uočena samo u odnosu na gonadotropne adenome ($p < 0.001$) (grafikon 4). Posmatrajući podtipove HR produkujućih adenoma (tabela 8), slabo granulirani adenomi, prikazani kao jedna grupa su pokazali statistički značajno više vrednosti p21 pozitivnih jedara u odnosu na gusto granulirane adenome ($p=0.001$). Kada smo podelili sve HR produkujuće adenome u odnosu na dodatnu produkciju hormona na adenome koji produkuju samo HR, mešovite HR-PRL i plurihormonalne HR produkujuće adenome, uočeno je da je statistički značajna razlika u procentu p21 pozitivnih jedara prisutna samo između slabo i gusto granulirane varijante adenoma koji produkuju samo HR ($p=0.004$). Ova razlika nije uočena između slabo i gusto granulirane varijante HR produkujućih adenoma sa ko-produkcijom drugih hormona (SG-HR-PRL vs. GG-GH-PRL $p = 0.590$; SG-Pluri-HR vs. GG-Pluri-GH $p = 0.127$) (grafikon 5).

Grafikon 4: Procenat p21 pozitivnih jedara sa standardnim devijacijama u normalnoj adenohipofizi, svim adenomima i tipovima adenoma hipofize

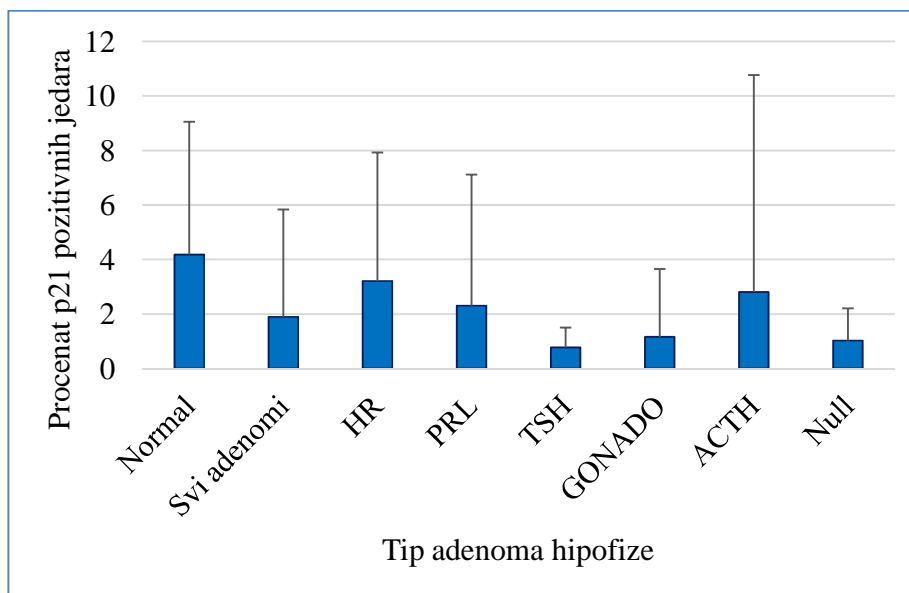
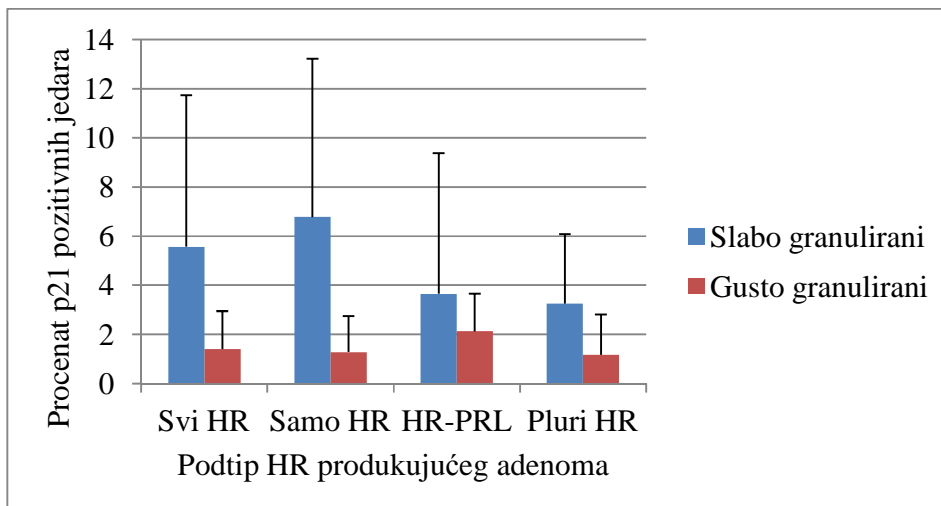


Tabela 8: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti nuklearne imunohistohemijske ekspresije p21 u podtipovima HR produkujućeg adenoma hipofize

Podtip HR produkujućeg adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
SG-svi HR	5.57	6.17	2.90	0.05	23.80
GG-svi HR	1.41	1.54	0.65	0.04	4.53
SG-samo HR	6.78	6.44	3.66	0.52	23.80
GG-samo HR	1.28	1.47	0.64	0.04	5.12
SG-HR-PRL	3.66	5.73	1.44	0.05	17.61
GG-HR -PRL	2.13	1.54	1.89	0.11	4.53
SG-Pluri-HR	3.25	2.84	2.40	0.94	6.42
GG-Pluri-HR	1.17	1.65	0.42	0.09	6.27

Grafikon 5: Procenat p21 pozitivnih jedara sa standardnim devijacijama u podtipovima HR produkujícíeg adenoma



4.6 Citoplazmatska p21 ekspresija u adenomima hipofize

Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti p21 CSB (Slika 4b) u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize i u tipovima adenoma hipofize su prikazane u tabelama 9 i 10, kao i na grafikonu 6.

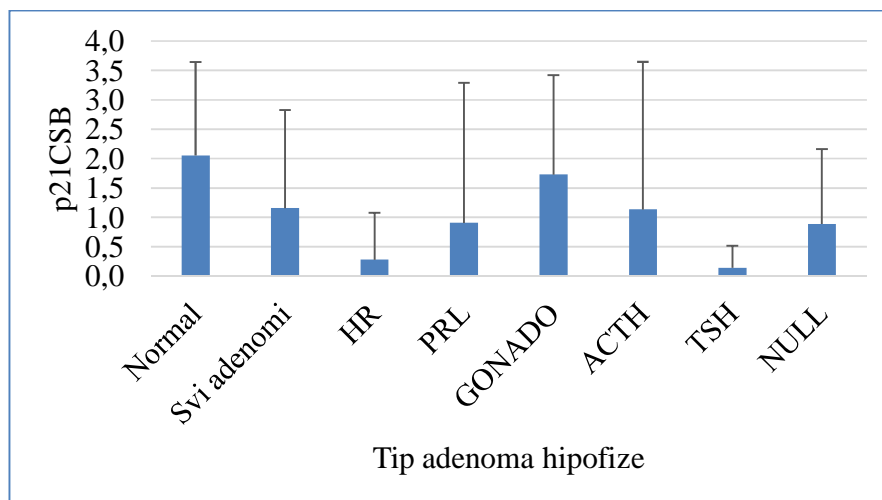
Tabela 9: CSB p21 srednja vrednost, standardna devijacija, kao i minimalna i maksimalna vrednost u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize

Grupa	Srednja vrednost	SD	Min	Max
Eksperimentalna p21 CSB	1.10	1.51	0	8

Tabela 10: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti p21 CSB u adenomima hipofize

Tip adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
PRL	0.91	2.38	0.00	0	8
HR	0.28	0.79	0.00	0	4
GONADO	1.73	1.69	1.00	0	9
ACTH	1.14	2.51	1.00	0	12
TSH	0.14	0.37	0.00	0	1
Null	0.89	1.27	0.00	0	4

Grafikon 6: p21 CSB sa standardnim devijacijama u normalnoj adenohipofizi, svim adenomima hipofize i tipovima adenoma hipofize



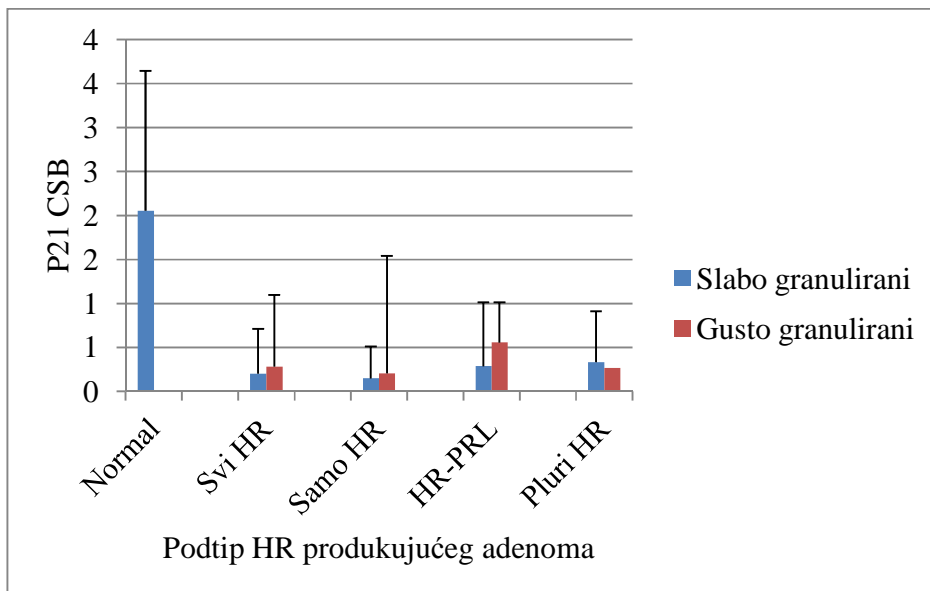
Gonadotropni adenomi pokazuju najviši p21 CSB, koji je statistički značajno viši od TSH produkujućih adenoma ($p=0.034$) i HR produkujućih adenoma ($p<0.001$).

Statistički značajne razlike između podtipova HR produkujućih adenoma po pitanju p21 CSB nisu uočene (tabela 11, grafikon 7).

Tabela 11: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti p21 CSB u podtipovima GH produkujućih adenoma hipofize

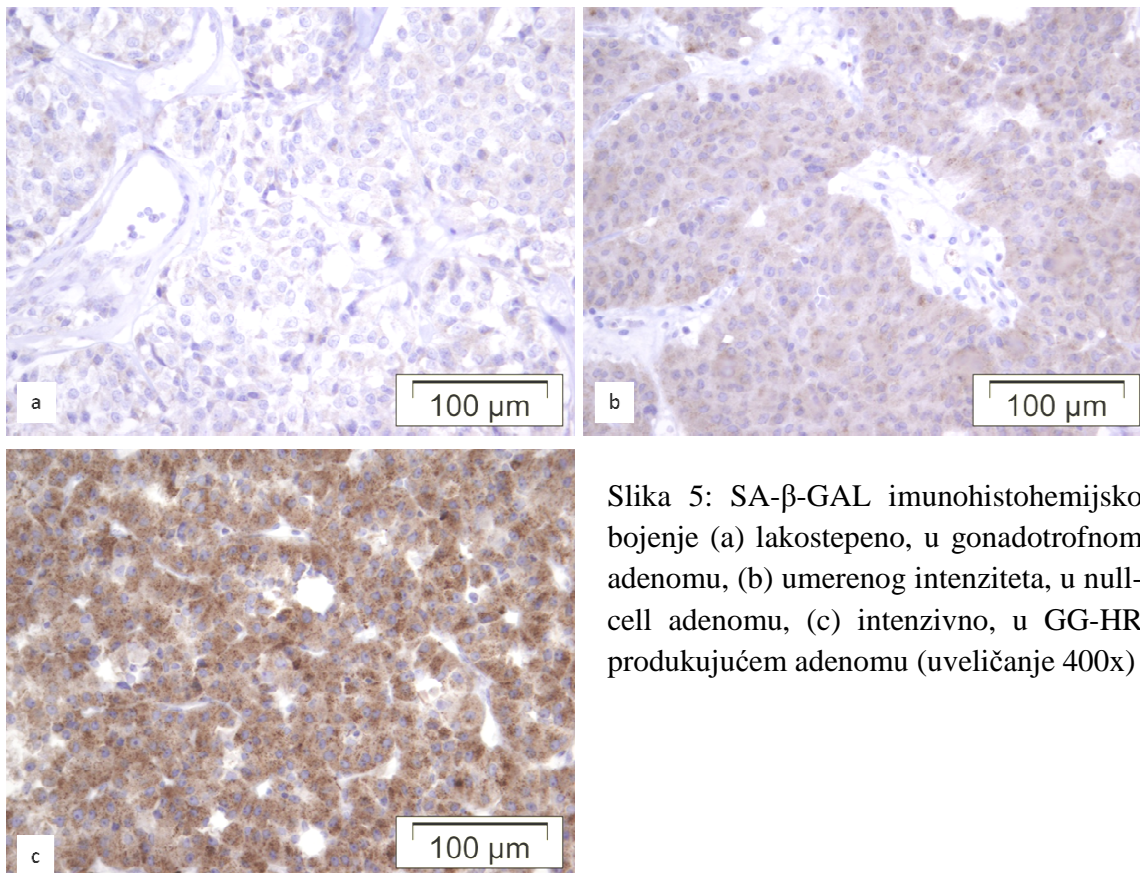
Podtip HR produkujućeg adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Median	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
SG-svi HR	0.20	0.51	0.00	0.00	1.00
GG-svi HR	0.28	0.84	0.00	0.00	4.00
SG-samoHR	0.15	0.36	0.00	0.00	1.00
GG-samoHR	0.21	0.81	0.00	0.00	4.00
SG-HR-PRL	0.29	0.73	0.00	0.00	2.00
GG-HR-PRL	0.56	1.33	0.00	0.00	4.00
SG-Pluri-HR	0.33	0.58	0.00	0.00	1.00
GG-Pluri-HR	0.27	0.46	0.00	0.00	1.00

Grafikon 7: p21 CSB sa standardnom devijacijom u normalnoj adenohipofizi i podtipovima HR produkujućih adenoma



4.7 Ekspresija SA- β -GAL u adenomima hipofize

Imunohistohemijsko bojenje na SA- β -GAL je bilo difuzno na svim analiziranim uzorcima adenoma hipofize, a razlike u intenzitetu bojenja su uočene između pojedinih tipova adenoma. U tkivu adenohipofize uočene su razlike u intenzitetu bojenja između acinusa i između samih ćelija (slika 5 i 6, g i h).



Slika 5: SA-β-GAL imunohistohemijsko bojenje (a) lakostepeno, u gonadotrofnom adenomu, (b) umerenog intenziteta, u null-cell adenomu, (c) intenzivno, u GG-HR produkujućem adenomu (uveličanje 400x)

Broj adenoma hipofize i njihova procentualna zastupljenost u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize i tipovima adenoma hipofize, u odnosu na intenzitet imunohistohemijskog bojenja na SA-β-GAL je prikazana u tabelama 12 i 13 i grafikonu 8.

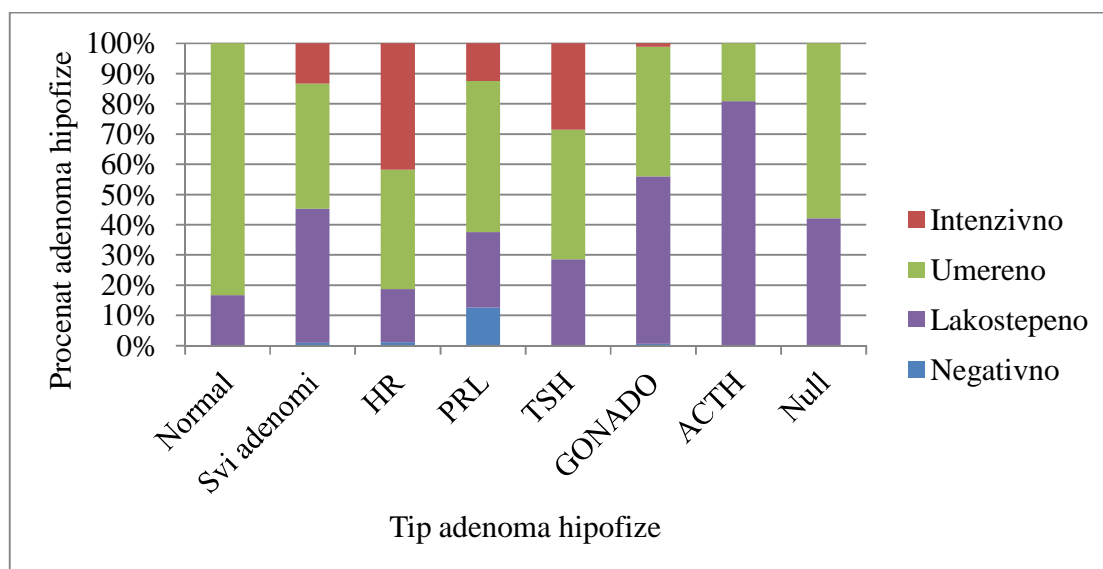
Tabela 12: Broj i procentualna zastupljenost slučajeva u eksperimentalnoj grupi adenoma u odnosu na intenzitet bojenja na SA-β-GAL

Naziv grupe	SA-β-GAL			
	negativno	lakostepeno	umereno	intenzivno
Eksperimentalna grupa - broj i procentualna zastupljenost slučajeva	0.9% (n=3)	44.7% (n=144)	41.0% (n=132)	13.4% (n=43)

Tabela 13: Broj adenoma unutar tipova adenoma hipofize i njihova procentualna zastupljenost u odnosu na intenzitet bojenja na SA- β -GAL

Tip adenoma		Intenzitet bojenja na SA- β -GAL			
		Negativno	Lakostepeno	Umereno	Intenzivno
PRL	Broj adenoma	1	2	4	1
	%	12.5%	25.0%	50.0%	12.5%
HR	Broj adenoma	1	16	36	38
	%	1.1%	17.6%	39.6%	41.8%
GONADO	Broj adenoma	1	98	76	2
	%	0.6%	55.4%	42.9%	1.1%
ACTH	Broj adenoma	0	17	4	0
	%	0.0%	81.0%	19.0%	0.0%
TSH	Broj adenoma	0	2	3	2
	%	0.0%	28.6%	42.9%	28.6%
NULL	Broj adenoma	0	8	11	0
	%	0.0%	42.1%	57.9%	0.0%

Grafikon 8: Grafički prikaz procentualne zastupljenosti adenoma hipofize u odnosu na intenzitet bojenja SA-β-GAL u različitim tipovima adenoma hipofize i normalnoj adenohipofizi



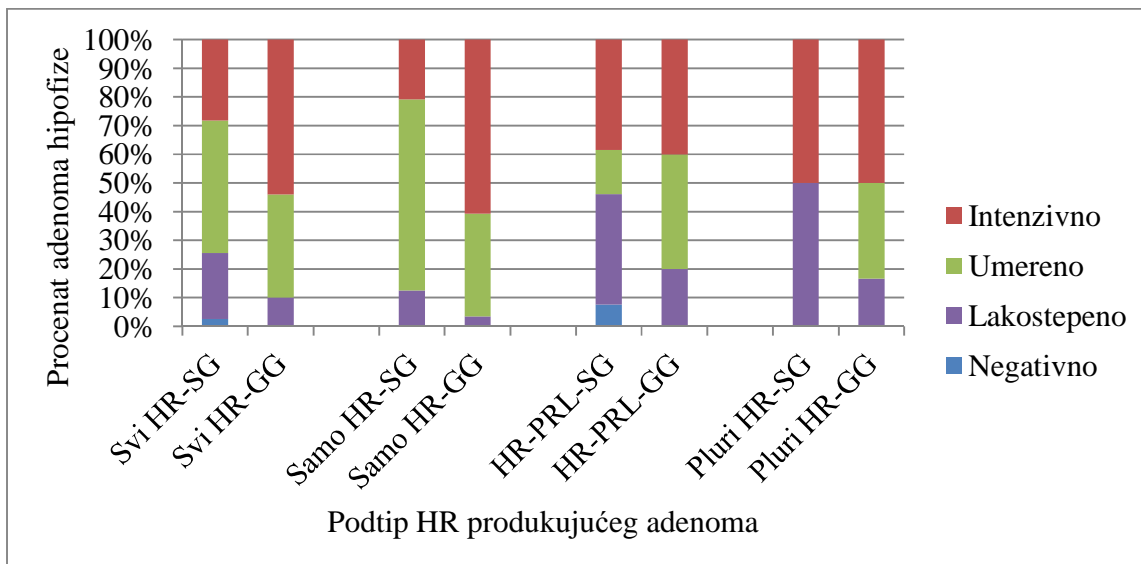
Najveći intenzitet bojenja je uočen kod HR produkujućih adenoma, pri čemu je ova vrednost dostigla statističku značajnost u odnosu na ACTH produkujuće ($p < 0.001$), gonadotrofne ($p < 0.001$) i null-cell ($p = 0.025$) adenome.

Broj adenoma hipofize u odnosu na intenzitet SA-β-GAL bojenja unutar HR produkujućih podtipova adenoma hipofize je prikazan u tabeli 14 i grafikonu 9.

Tabela 14: Broj adenoma hipofize unutar HR produkujućih podtipova i njihova procentualna zastupljenost u odnosu na intenzitet bojenja na SA- β -GAL

Podtip HR produkujućeg adenoma		Intenzitet bojenja na SA- β -GAL			
		Negativno	Lakostepeno	Umereno	Intenzivno
Svi HR-SG	Broj adenoma	1	9	18	11
	%	3%	23%	46%	28%
Svi HR-GG	Broj adenoma	0	5	18	27
	%	0%	3.6%	35.7%	60.7%
SG-samo HR	Broj adenoma	0	3	16	5
	%	0.0%	12.5%	66.7%	20.8%
GG-samo HR	Broj adenoma	0	1	10	17
	%	0.0%	3.6%	35.7%	60.7%
SG-HR-PRL	Broj adenoma	1	5	2	5
	%	7.7%	38.5%	15.4%	38.5%
GG-HR-PRL	Broj adenoma	0	2	4	4
	%	0%	20.0%	40.0%	40.0%
SG-Pluri-HR	Broj adenoma	0	1	0	1
	%	0%	50.0%	0%	50.0%
GG-Pluri-HR	Broj adenoma	0	2	4	6
	%	0%	16.7%	33.3%	50.0%

Grafikon 9: Procentualna zastupljenost slabo i gusto granuliranih HR produkujućih adenoma hipofize u odnosu na intenzitet bojenja na SA- β -GAL



Gusto granulirani HR produkujći adenomi su pokazali statistički značajno jači intenzitet bojenja u odnosu na slabo granulirane adenome ($p=0.010$). Analizirajući razlike između slabo i gusto granuliranih varijanti HR produkujćih adenoma, u odnosu na ko-produkciju drugih hormona (PRL, FSH, LH i TSH), uočeno je da statistički značajna razlika postoji između slabo i gusto granuliranih adenoma koji produkuju samo HR ($p=0.04$), ali ne i između slabo i gusto granuliranih varijanti mešovitog HR-PRL ($p=0.228$) i plurihormonalnih ($p=0.475$) adenoma (tabela 14, grafikon 9).

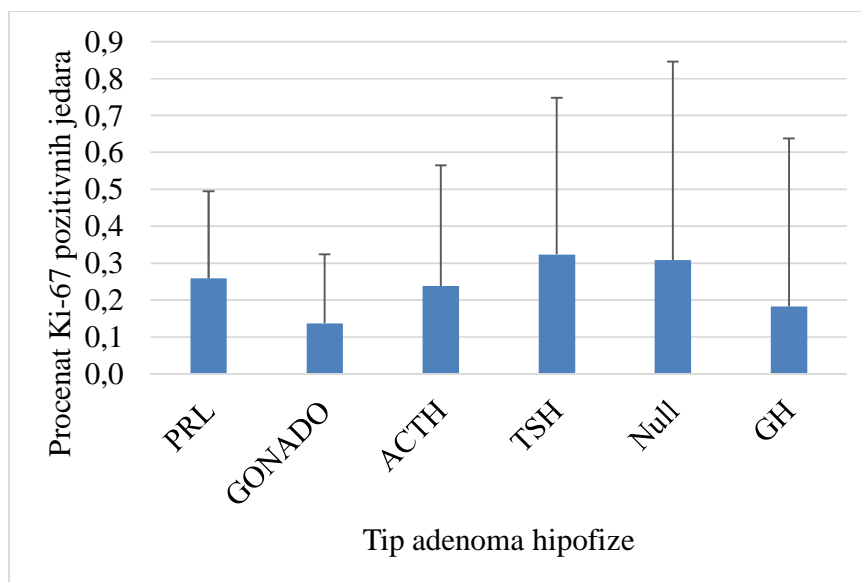
4.8 Ki-67 u adenomima hipofize

Srednje vrednosti, zajedno sa standardnim devijacijama, medijanom, minimalnim i maksimalnim vrednostima procenata Ki-67 pozitivnih jedara su prikazane u tabeli 15 i grafikonu 10.

Tabela 15: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti procenata Ki-67 pozitivnih jedara u tipovima adenoma hipofize

Tip adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Mediana	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
PRL	0.26	0.23	0.16	0.00	0.69
HR	0.18	0.45	0.09	0.00	4.33
GONADO	0.29	1.54	0.11	0.00	20.83
ACTH	1.25	4.90	0.14	0.01	23.71
TSH	0.32	0.42	0.13	0.01	1.26
Null	0.34	0.61	0.12	0.01	2.74
Total	0.20	0.40	0.10	0.00	4.34

Grafikon 10: Srednje vrednosti procenata Ki-67 pozitivnih jedara sa standardnom devijacijom u tipovima adenoma hipofize



Statistički značajne razlike između tipova i podtipova adenoma hipofize nisu uočene po pitanju procenata Ki-67 pozitivnih jedara.

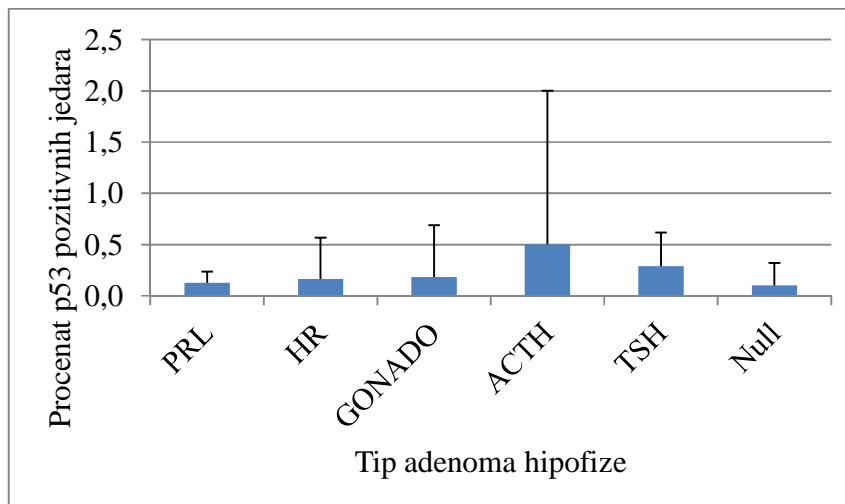
4.9 p53 u adenomima hipofize

Srednje vrednosti, zajedno sa standardnim devijacijama, medijanom, minimalnim i maksimalnim vrednostima procenata p53 pozitivnih jedara su prikazane u tabeli 16 i grafikonu 11.

Tabela 16: Srednje vrednosti, standardna devijacija, medijana, minimalne i maksimalne vrednosti procenata p53 pozitivnih jedara u tipovima adenoma hipofize

Tip adenoma	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Median	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost
PRL	0.13	0.11	0.09	0.02	0.33
HR	0.16	0.40	0.04	0.00	2.86
GONADO	0.18	0.51	0.03	0.00	4.84
ACTH	0.50	1.50	0.04	0.00	7.22
TSH	0.29	0.32	0.17	0.02	0.94
Null	0.10	0.22	0.04	0.00	0.99

Grafikon 11: Srednje vrednosti procenata p53 pozitivnih jedara sa standardnom devijacijom u tipovima adenoma hipofize



Statistički značajne razlike u procentu p53 pozitivnih jedara između tipova adenoma hipofize nisu uočene.

4.10 Razlike između kontrolnih grupa

Srednje vrednosti, standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti procenta p16 i p21 pozitivnih jedara i p21 CSB, kao i procentualna zastupljenost u odnosu na intenzitet SA- β -GAL bojenja u kontrolnim grupama sačinjenih iz normalnih adenohipofiza su prikazane u tabelama 17 i 18.

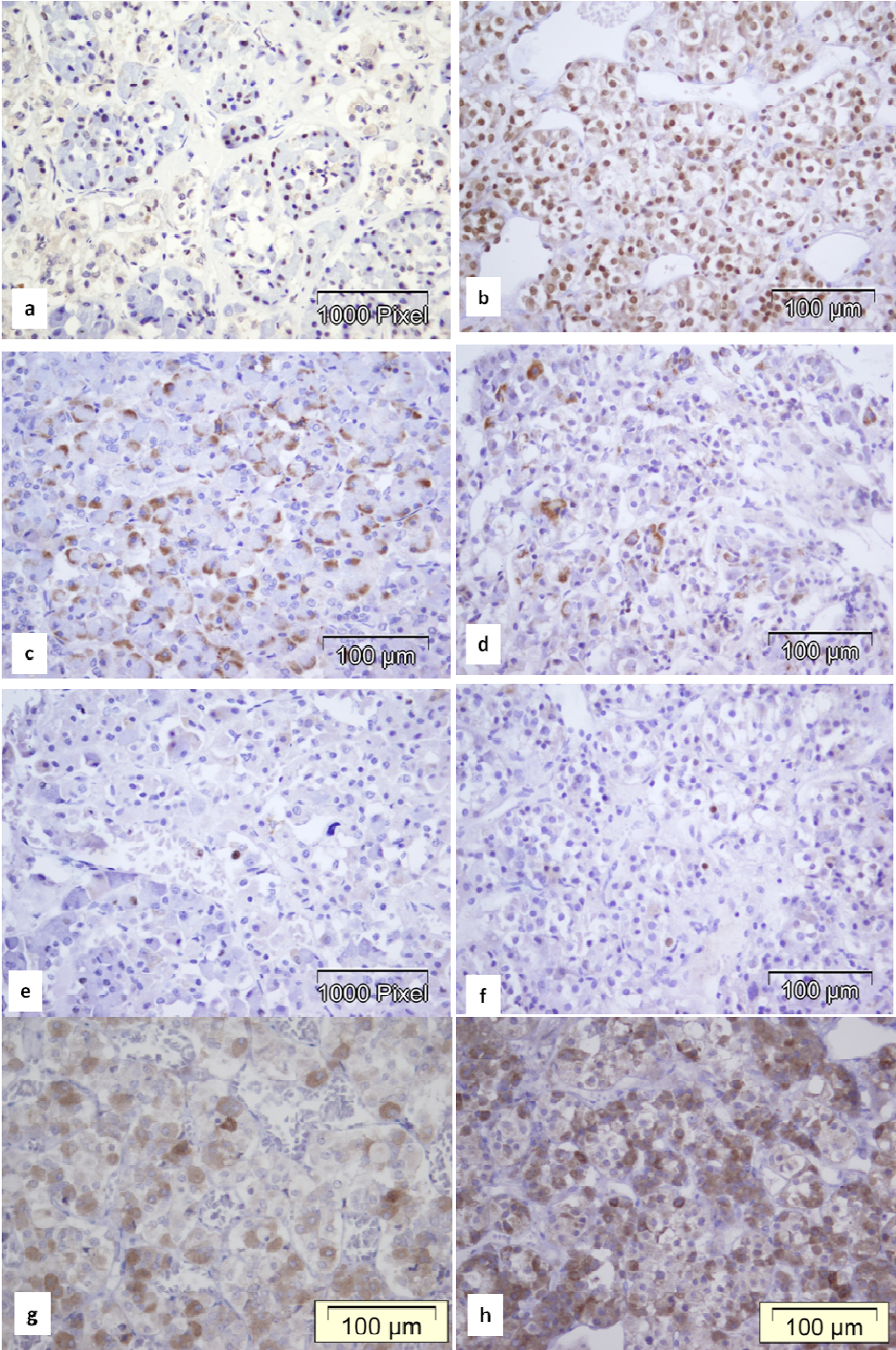
Tabela 17: Srednje vrednosti procenata p16 i p21 pozitivnih jedara i p21 CSB u kontrolnim grupama normalnih hipofiza

Grupa		Srednja vrednost	SD	Min	Max
p16 (%)	kontrolna biopsija	43.63	22.35	0.14	71.11
	kontrolna autopsija	58.90	15.43	24.36	81.54
p21 nuklearno (%)	Kontrolna biopsija	4.19	4.87	0.42	20.64
	Kontrolna autopsija	2.98	2.11	0.47	10.80
p21 citoplazmatski (CSB)	kontrolna biopsija	2.06	1.59	0	6
	kontrolna autopsija	2.73	1.31	0	6

Tabela 18: Procenat i broj normalnih adenohipofiza u odnosu na intenzitet SA- β -GAL bojenja u kontrolnim grupama

Naziv grupe	SA- β -GAL			
	negativno	lakostepeno	umereno	intenzivno
Kontrolna biopsija – broj i procentualna zastupljenost slučajeva	0.0% (n=0)	16.7% (n=3)	83.3% (n=15)	0.0% (n=0)
Kontrolna autopsija - broj i procentualna zastupljenost slučajeva	0.0% (n=0)	16.9% (n=10)	83.1% (n=49)	0.0% (n=0)

Imunohistohemijsko bojenje na p16 , p21 i SA- β -GAL u tkivu adenohipofize prikazano je na slici 6.



Slika 6: Imunohistohemijska ekspresija p16 u (a) autopsijskoj i (b) biopsijskoj adenohipofizi; citoplazmatska p21 imunoekspresija u (c) autopsijskoj i (d) biopsijskoj adenohipofizi; nuklearna p21 imunopozitivnost u (e) autopsijskoj i (f) biopsijskoj adenohipofizi; imunohistohemijska ekspresija β -galaktozidaze u (g) autopsijskoj i (h) biopsijskoj adenohipofizi (uveličanje svih slika x400)

Prilikom poređenja dve kontrolne grupe, autopsijske i biopsijske, po pitanju nuklearne ekspresije p16 i p21, kao i citoplazmatske ekspresije p21 i β -galaktozidaze, uočene su sledeće statistički značajne razlike:

- Procenat p16 pozitivnih jedara je značajno bio viši u autopsijskoj grupi ($p = 0.006$)
- p21 CSB je bio značajno viši u autopsijskoj grupi ($p = 0.039$).

Nuklearna p21 pozitivnost je pokazivala nešto više vrednosti u biopsijskoj grupi, ali bez dostizanja statističke značajnosti ($p = 0.051$).

Slučajevi koji su sačinjavali autopsijsku grupu su bili značajno stariji od pacijenata iz biopsijske grupe ($p \leq 0.001$).

U cilju utvrđivanja da li su razlike u ekspresiji markera p16, p21 i β -galaktozidaze uslovljene razlikom u starosti pacijenata, izvršili smo komparacije u ekspresiji gore navedenih markera između slučajeva koji se nalaze u istim starosnim dekadama. Prilikom vršenja analize pojavila su se izvesna ograničenja: komparacija nije mogla biti izvršena za uzrasnu grupu starijih od 70 godina u autopsijskoj grupi, kao i za uzrasnu grupu mlađih od 20 godina i u intervalu 21-30 godina, budući da u grupi za komparaciju nisu postojali slučajevi navedene uzrasne dobi. Komparacija takođe nije mogla biti urađena za uzraste 31-40 godina i 41-50 godina, budući da se u grupama nalazio po jedan pacijent, što je nedovoljno za statističku analizu. Statistička analiza je izvršena za uzrasne grupe 51-60 godina i 61-70 godina. Statistički značajna razlika je uočena po pitanju vrednosti nuklearnog p21, koja je bila viša u biopsijskoj grupi ($p = 0.026$).

Ispitujući korelacije navedenih markera u kontrolnim grupama, uočena je statistički značajna korelacija između sledećih markera:

- nuklearne i citoplazmatske p21 pozitivnosti u autopsijskoj grupi (koeficijent korelacije 0.547, $p = 0.000$),

- nuklearne i citoplazmatske p21 pozitivnosti u biopsijskoj grupi (koeficijent korelacije 0.760, $p = 0.000$)
- p16 i citoplazmatske p21 pozitivnosti u autopsijskoj grupi (koeficijent korelacije 0.394; $p = 0.002$)
- p16 i nuklearne p21 pozitivnosti u autopsijskoj grupi (koeficijent korelacije 0.401; $p = 0.001$)

Statistički značajna korelacija između PMI i analiziranih markera nije uočena.

U cilju procene uticaja PMI na ekspresiju analiziranih markera, izvršili smo poređenje vrednosti markera p16, p21 i β -galaktozidaze između autopsijske grupe sa $PMI \leq 12h$, sa jedne strane i biopsijske grupe i sa PMI u intervalu 49-96h. Statistički značajna razlika nije uočena.

Zbog prikazanih statistički značajnih razlika između autopsijske i biopsijske kontrolne grupe, u daljem toku istraživanja je korišćena samo biopsijska kontrolna grupa.

4.11 Razlike između kontrolne grupe i adenoma hipofize prikazanih kao jedna grupa

Statistički značajna razlika je uočena između biopsijske kontrolne grupe i eksperimentalne grupe adenoma hipofize po pitanju svih analiziranih markera (p16, p21 (nuklearno i citoplazmatski) i SA- β -GAL).

Procenat p16 i p21 pozitivnih jedara, kao i p21 CSB su bili statistički značajno niži u adenomima hipofize, u poređenju sa ekspresijom u tkivu adenohipofize (grafikoni 2, 4 i 6) (p16, $p < 0.000$; p21 nuklearno $p < 0.000$; p21 citoplazmatski $p = 0.002$). Intenzitet bojenja na SA- β -GAL je bio statistički značajno veći u grupi adenoma hipofize, u poređenju sa tkivom normalne adenohipofize ($p = 0.014$) (grafikon 8).

4.12 Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u ekspresiji p16

Svi tipovi i podtipovi adenoma hipofize su pokazali statistički značajno niže vrednosti p16, u poređenju sa normalnom adenohipofizom (tabela 19, grafikon 2).

Tabela 19: p vrednosti dobijene komparacijom procenata p16 pozitivnih jedara u normalnoj adenohipofizi i adenomima hipofize

P16	HR	PRL	TSH	GONADO	ACTH	Null
P vrednosti, normalna adenohipofiza vs. tip adenoma hipofize	0.000	0.001	0.007	0.000	0.000	0.000

4.13 Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u nuklearnoj ekspresiji p21

Gonadotropni i null-cell adenomi su pokazali statistički značajno niže vrednosti procenta p21 pozitivnih jedara u odnosu na kontrolnu grupu (normalna adenohipofiza vs. gonadotropni $p < 0.001$; normalna adenohipofiza vs. null-cell $p = 0.048$) (grafikon 4).

4.14 Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u citoplazmatskoj p21 ekspresiji

U poređenju sa ekspresijom u normalnoj adenohipofizi, statistički značajno niže vrednosti p21 CSB su uočene kod prolaktinoma ($p=0.036$), TSH produkujućih adenoma ($p=0.016$) i HR produkujućih adenoma ($p<0.001$) (grafikon 6).

4.15 Razlike između adenohipofize i podgrupa adenoma hipofize u ekspresiji SA- β -GAL

Statistički značajno niži intenzitet bojenja SA- β -GAL od normalne adenohipofize su pokazali ACTH ($p=0.001$) i gonadotropni ($p=0.010$) adenomi. HR, TSH i PRL produkujući adenomi su pokazali jači intenzitet bojenja u odnosu na bojenje normalne adenohipofize, ali p vrednosti nisu dostigle vrednosti statističke značajnosti (grafikon 8). Međutim, statistička značajno viša vrednost intenziteta je uočena kod gusto granuliranih HR produkujućih adenoma (videti poglavlje o ekspresiji SA- β -GAL u podtipovima HR produkujućih adenoma).

4.16 Poređenje ekspresije p16, p21, p53, Ki-67 i SA-β-GAL grupe recidivantnih sa grupom nerecidivantnih adenoma

Među pacijentima koji su ispunili inkluzione kriterijume ove studije bilo je 19 onih koji su operisani dva puta, a čija su oba uzorka uključena u istraživanje. Broj adenoma u prvoj i drugoj hirurškoj intervenciji, prosečna vrednost ekspresije sa standardnom devijacijom i opsegom vrednosti markera p16, p21, p53, Ki-67 i SA-β-GAL su prikazani u tabelama 20 i 21. Prosečna vrednost vremenskog razmaka između prve i druge intervencije je iznosila 1.471 ± 1.736 godina. Vremenski razmak između hirurških intervencija je varirao od 0 do 6 godina.

Tabela 20: Broj, prosečna vrednost ekspresije sa standardnom devijacijom i opsegom vrednosti markera p16, p21, p53 i Ki-67 pacijenata čiji su adenomi hipofize dva puta hirurški tretirani

Naziv markera i redni broj hirurške intervencije	Srednja vrednost	SD	Min.	Max.
p16 - 1	2.72	2.76	0.05	9.26
p16 - 2	4.21	4.31	0.05	14.45
p21 n - 1	2.76	5.95	0.04	25.44
p21n - 2	2.17	3.74	0.10	15.79
p21c - 1	1.68	3.04	0	12
p21c - 2	1.50	2.09	0	8
Ki-67 - 1	0.24	0.44	0.03	1.90
Ki-67 - 2	1.56	5.26	0.02	22.61
p53 - 1	0.13	0.22	0.01	0.79
p53 - 2	0.17	0.32	0.01	1.34

Legenda: n – nuklearno; c – citoplazmatski

Tabela 21: Intenzitet imunohistohemijskog bojenja na SA- β -GAL u prvoj i drugoj hirurškoj intervenciji

Redni broj hirurške intervencije	SA- β -GAL intenzitet bojenja (%)			
	Negativno	Lakostepeno	Umereno	Intenzivno
Prva	0%	43.75%	43.75%	12.5%
Druga	0%	50%	50%	0%

Komparacijom vrednosti analiziranih markera p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL između dve grupe tumora (sa prve i sa druge hirurške intervencije), pacijenata koji su dva puta operisani, statistički značajna razlika je uočena samo po pitanju vrednosti Ki-67 ($p = 0.025$), koja je bila viša u drugoj intervenciji (tabela 22). Prosečne vrednosti p16 i p53 su pokazivale tendenciju blagog porasta, dok su nuklearni i citoplazmatski p21 pokazivale tendenciju blagog pada.

Srednja vrednost procenta p21 pozitivnih jedara u grupi recidivantnih adenoma na prvoj hirurškoj intervenciji je pokazala nešto više vrednosti u odnosu na srednju vrednost p21 pozitivnih jedara u eksperimentalnoj grupi adenoma hipofize, ali bez statističke značajnosti. Statistički značajna razlika između ove dve grupe takođe nije uočena po pitanju p21 CSB, gde su vrednosti takođe bile nešto niže u eksperimentalnoj grupi. Vrednosti procenta p16 pozitivnih jedara su bile nešto više u grupi recidivantnih adenoma na prvoj hirurškoj intervenciji, takođe bez statističke značajnosti.

Tabela 22: p vrednosti poređenja vrednosti markera p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL na prvoj i drugoj hirurškoj intervenciji

Naziv markera	p
p16	0.31
p21 nuklearno	0.40
p21 citoplazmatski	0.88
SA- β -GAL	0.21
Ki-67	0.02
p53	0.94

4.17 Ispitivanje korelacije ekspresije p16 i p21 sa kliničkim podacima pacijenata (pol, uzrast, indeks telesne mase, veličina tumora, invazivnost tumora)

Srednja vrednost ekspresije sa standardnom devijacijom i opsegom vrednosti markera p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL u adenomima hipofize kod oba pola je prikazana u tabelama 23 i 24.

Tabela 23: Srednja vrednost ekspresije sa standardnom devijacijom i opsegom vrednosti markera p16, p21, p53 i Ki-67 u adenomima hipofize kod oba pola

	Pol	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Mediana	Minimum	Maximum
% p21 pozitivnih jedara	muški	1.96	4.39	0.47	0.01	38.68
	ženski	2.06	3.52	0.52	0.01	19.02
p21 citoplazmatski	muški	1.30	1.77	1.00	0.00	12.00
	ženski	1.08	1.55	1.00	0.00	9.00
% p16 pozitivnih jedara	muški	6.00	7.64	3.59	0.03	57.22
	ženski	8.72	14.32	3.97	0.05	71.11
% Ki-67 pozitivnih jedara	muški	0.32	1.73	0.11	0.00	23.71
	ženski	0.32	1.70	0.11	0.00	20.83
% p53 pozitivnih jedara	muški	0.21	0.62	0.04	0.00	7.22
	ženski	0.17	0.53	0.04	0.00	4.84

Tabela 24: Broj adenoma hipofize i njihova procentualna zastupljenost kod polova u odnosu na intenzitet bojenja na SA- β -GAL

	SA- β -GAL			
	Negativno	Lakostepeno	Umereno	Intenzivno
Muški	0.54% (n=1)	43.78% (n=81)	45.40% (n=84)	10.27% (n=19)
Ženski	1.28% (n=2)	41.67% (n=65)	41.67% (n=65)	15.38% (n=24)

Statistički značajne razlike u ekspresiji markera p16, p21 (citoplazmatski i nuklearno), p53, Ki-67 i SA- β -GAL između polova nisu uočene. Prosečne vrednosti markera su bile sličnih vrednosti, uzusev za p16, gde je uočena nešto viša vrednost kod

žena. Kod žena je takođe uočena lakostepeno intenzivnije SA- β -GAL bojenje, bez statistički značajne razlike.

Statistički značajna korelacija između uzrasta pacijenata i analiziranih markera (p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL) je uočena samo za citoplazmatski p21 (koeficijent korelacije 0.360, $p = 0.000$) i SA- β -GAL (koeficijent korelacije -0.130, $p = 0.020$).

Indeks telesne mase je bio dostupan za 122 pacijenta, sa rasponom između 17.2 i 41.1, prosečnom vrednošću 28.16 i standardnom devijacijom 4,81.

Ispitivanjem korelacije između analiziranih markera (p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL) i ITM, statistički značajna korelacija je uočena samo kod citoplazmatske p21 ekspresije (koeficijent korelacije 0.198, $p = 0.033$).

U odnosu na veličinu, adenomi hipofize su podeljeni na mikroadenome (prečnika manjeg od 1cm), makroadenome (prečnika između 1 i 4cm) i gigantske adenome (prečnika većeg od 4cm). Broj adenoma kod kojih je bio dostupan podatak o dimenzijama tumora, sa srednjim vrednostima analiziranih markera (p16, p21 nuklearno i citoplazmatski, Ki-67, p53 i SA- β -GAL), standardnim devijacijama, minimalnim i maksimalnim vrednostima su prikazani u tabelama 25 i 26.

Tabela 25: Broj adenoma, prosečna vrednost ekspresije sa standardnom devijacijom i opsegom vrednosti markera p16, p21, p53 i Ki-67 u odnosu na veličinu adenoma

Naziv markera	Dimenzije tumora	Broj tumora	Srednja vrednost	SD	Min.	Max.
p21 nuklearno	Mikroadenom	5	0.47	0.41	0.03	1.12
	Makroadenom	242	1.15	2.06	0.01	19.02
	Gigantski adenom	7	1.56	2.18	0.04	6.02
p21 citoplazmatski	Mikroadenom	5	0.20	0.45	0	1
	Makroadenom	238	1.33	1.57	0	8
	Gigantski adenom	7	1.57	1.62	0	4
p16	Mikroadenom	5	8.73	3.30	6.27	14.26
	Makroadenom	238	4.85	5.26	0.03	31.60
	Gigantski adenom	7	6.23	4.31	0.86	12.13
Ki-67	Mikroadenom	5	0.14	0.11	0.04	0.30
	Makroadenom	246	0.21	0.37	0.00	3.34
	Gigantski adenom	7	0.34	0.33	0.01	0.78
p53	Mikroadenom	5	0.13	0.22	0.01	0.52
	Makroadenom	245	0.18	0.48	0.00	4.84
	Gigantski adenom	7	0.34	0.36	0.01	0.86

Grupu mikroadenoma su sačinjavala dva ACTH i tri HR produkujuća adenoma, dok se u grupi gigantskih adenoma nalazilo 5 gonadotropnih i 2 HR produkujuća adenoma.

Tabela 26: Procentualna zastupljenost adenoma hipofize unutar podgrupa mikroadenoma, makroadenoma i gigantskih adenoma u odnosu na intenzitet bojenja SA- β -GAL

Veličina tumora	Intenzitet bojenja			
	Negativno	Lakostepeno	Umereno	Intenzivno
Mikroadenom	0% (n=0)	50% (n=2)	50% (n=2)	0% (n=0)
Makroadenom	1.3% (n=3)	51.3% (n=118)	42.2% (n=97)	5.2% (n=12)
Gigantski adenom	0% (n=0)	28.6% (n=2)	71.4% (n=5)	0% (n=0)

Prilikom međusobnog poređenja podgrupa adenoma hipofize i ekspresije markera p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL, statistički značajna razlika je uočena samo po pitanju p16 između mikroadenoma i makroadenoma ($p = 0.019$), pri čemu su vrednosti bile više kod mikroadenoma.

Ispitivanje korelacije veličine tumora i analiziranih makera nije moglo biti učinjeno zbog prirode podataka (adenomi razvrstavani u grupe prema veličini).

U odnosu na propagaciju tumora, adenomi hipofize su podeljeni u tri grupe: adenome sa supraselarnom propagacijom, adenome sa supraselarnom i paraselarnom propagacijom i u grupu „ostali“, u koju spadaju svi drugi, znatno ređi načini propagacije (infraselarno, retroselarno, paraselarno unilateralno). Broj adenoma, prosečna vrednost ekspresije sa standardnom devijacijom i opsegom vrednosti markera p16, p21, p53 i Ki-67 u odnosu na propagaciju tumora je prikazana u tabeli 27.

Tabela 27: Broj adenoma, prosečna vrednost ekspresije sa standardnom devijacijom i opsegom vrednosti markera p16, p21, p53 i Ki-67 u odnosu na propagaciju adenoma

Naziv markera	Propagacija adenoma	Broj tumora	Srednja vrednost	SD	Min.	Max.
p21 nuklearno	Supraselarno	42	1.09	2.22	0.02	14.00
	Supra/paraselarno	32	2.02	2.445	0.03	9.86
	Ostalo	17	1.68	3.18	0.09	11.96
p21 citoplazmatski	Supraselarno	42	1.21	1.46	0	4
	Supra/paraselarno	32	1.12	1.86	0	8
	Ostalo	16	0.44	1.03	0	4
p16	Supraselarno	42	5.60	5.60	0.10	27.45
	Supra/paraselarno	32	3.96	3.84	0.25	15.50
	Ostalo	18	5.73	7.25	0.08	27.12
Ki-67	Supraselarno	41	0.26	0.46	0.00	2.75
	Supra/paraselarno	32	0.27	0.27	0.03	1.27
	Ostalo	18	0.13	0.09	0.01	0.30
p53	Supraselarno	42	0.21	0.56	0.00	3.45
	Supra/paraselarno	32	0.19	0.33	0.00	1.34
	Ostalo	18	0.29	0.67	0.00	2.86

Procentualna zastupljenost adenoma hipofize u odnosu na intenzitet bojenja SA- β -GAL unutar podgrupa u zavisnosti od pravca propagacije prikazana je u tabeli 28.

Tabela 28: Procentualna zastupljenost adenoma hipofize unutar podgrupa u odnosu na intenzitet bojenja SA- β -GAL u zavisnosti od pravca propagacije

Propagacija	SA- β -GAL		
	Lakostepeno	Umereno	Intenzivno
Supraselarno	46.15% (n=18)	41.02% (n=16)	12.82% (n=5)
Supra i paraselarno	53.33% (n=16)	36.67% (n=11)	10% (n=3)
Ostalo	50% (n=8)	25% (n=4)	25% (n=4)

U međusobnom poređenju grupa adenoma hipofize podeljenih u odnosu na način širenja (supraselarno, supra/paraselarno i ostalo) po pitanju svih analiziranih markera (p16, p21, p53, SA- β -GAL i Ki-67), statistički značajna razlika je uočena samo između grupe „ostalo“ i grupe supra/paraselarno po pitanju Ki-67 ($p = 0.030$), pri čemu su vrednosti bile više u grupi sa supraselarnim širenjem. Vrlo blizu granice statističke značajnosti su bila sledeća poređenja: citoplazmatski p21 između supraselarnog i „ostalog“ širenja ($p = 0.052$); nuklearni p21 između supraselarnog i supra/paraselarnog širenja ($p = 0.062$); Ki-67 između supraselarnog i supra/paraselarnog širenja ($p = 0.096$). U preostalim poređenjima nije uočena statistički značajna razlika.

Ispitivanje korelacije propagacije i analiziranih makera nije moglo biti učinjeno zbog prirode podataka.

4.18 Ispitivanje međusobnih korelacija p16, p21, p53, Ki-67 i SA- β -GAL

Prilikom ispitivanja međusobne korelacije analiziranih markera (p16, p21, p53, SA- β -GAL i Ki-67), statistička značajnost je uočena između sledećih parova:

- p21 nuklearno i p21 citoplazmatski (koeficijent korelacije 0.153, $p = 0.005$),
- p21 nuklearno i Ki-67 (koeficijent korelacije 0.368, $p = 0.000$),

- p21 nuklearno i p53 (koeficijent korelacije 0.302, $p = 0.000$),
- p21 citoplazmatski i Ki-67 (koeficijent korelacije 0.231, $p = 0.000$),
- p16 i p53 (koeficijent korelacije 0.122, $p = 0.025$),
- Ki-67 i p53 (koeficijent korelacije 0.397, $p = 0.000$),
- SA- β -GAL i nuklearno p21 (koeficijent korelacije 0.179, $p = 0.001$),
- SA- β -GAL i p21 citoplazmatski (koeficijent korelacije -0.143, $p = 0.011$)
- SA- β -GAL i p16 (koeficijent korelacije 0.300, $p = 0.000$).

5. DISKUSIJA

U ovom istraživanju analizirana je imunohistohemijska ekspresija markera ćelijskog ciklusa p16 i p21, produkta tumor supresornog gena p53 i proliferativnog markera Ki-67 u grupi od 345 adenoma hipofize. Budući da su p16 i p21 takođe markeri senescencije, u istraživanje je uključen i široko primenjivani marker senescencije, β -galaktozidaza. Adenomi hipofize su, posmatrani kao jedna grupa, pokazali statistički značajno niže vrednosti p16 i p21 (nuklearno i citoplazmatski) u poređenju sa tkivom normalne adenohipofize. Za razliku od ovih markera, intenzitet bojenja na SA- β -GAL je bio veći u adenomima hipofize, nego u tkivu adenohipofize. Između podtipova adenoma hipofize, kao i između njih i tkiva normalne adenohipofize, su uočene brojne statistički značajne razlike u ekspresiji p16, p21 i SA- β -GAL, ukazujući na značajan uticaj produkcije hormona na njih. Za razliku od njih, nisu uočene značajne razlike u ekspresiji Ki-67 i p53 između podtipova adenoma.

Tkivni mikro niz (TMN) je metoda koja omogućava brzu, pouzdanu i jeftinu imunohistohemijsku analizu velikog broja tumora monomorfne građe. TMN je i na tkivu adenoma hipofize poznat kao pouzdana metoda (69-72). Naše istraživanje razlikuje od predašnjih činjenica da je urađeno na značajno većem broju uzoraka, kao i da je, prema našim saznanjima prvi put ispitivana senescencija u adenomima hipofize primenom imunohistohemije na TMN preparatima.

Inhibitor ciklin zavisne kinaze p21, lokalizovan nuklearno, ima važnu ulogu u zaustavljanju ćelijskog ciklusa na kontrolnim G1/S i G2/M tačkama, kao i u inicijaciji senescencije (44, 46). P53 je najznačajniji inicijator aktivnosti p21. Naime, p53 se sintetiše u većoj količini nakon detekcije poremećaja DNK, a u cilju kratkotrajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa tokom kojeg bi mehanizmi popravke bili aktivirani. Međutim, ukoliko je za popravku DNK neophodno aktivirati kompleksnije mehanizme, sintetiše se p21 koji u dužem vremenskom intervalu vrši inhibiciju ćelijskog ciklusa (47). U našem istraživanju najviše vrednosti procenata p21 pozitivnih jedara su uočene u HR produkujućim adenomima, pri čemu je statistički značajna razlika uočena samo u odnosu na gonadotrofne

adenome. Naši rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima, pri čemu je uzorak adenoma hipofize značajno (i do 10 puta) veći nego u prethodnim istraživanjima (68, 73, 74). Međutim, podelom HR produkujućih adenoma na slabo i gusto granulirane, uočena je statistički značajna razlika između ove dve grupe adenoma hipofize, pri čemu su više vrednosti uočene kod slabo granuliranih adenoma. Prema našim saznanjima, po prvi put je urađena komparacija slabo i gusto granuliranih adenoma hipofize u odnosu na nuklearnu p21 ekspresiju. Poznato je da se biološko ponašanje slabo i gusto granuliranih HR produkujućih adenoma značajno razlikuje. Slabo granulirani adenomi se javljaju u mlađoj populaciji, pokazuju agresivnije ponašanje, tendenciju invazije sfenoidalnog sinusa, kao i rezistenciju na terapiju somatostatinskim analogima (19, 20, 75-81). Znajući da p21 na nuklearnoj lokalizaciji uzrokuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa, ne bismo očekivali da slabo granulirani HR produkujući adenomi pokazuju biološki agresivno ponašanje. Ipak, ovakvo biološko ponašanje bi se moglo objasniti na nekoliko načina. Prvo, postoji mogućnost da se p21 sintetiše u većoj količini kao odgovor na poremećaj građe DNK. Sa druge strane, takođe postoji mogućnost da slabo granulirane adenome karakteriše poremećaj funkcije efektor na koje utiče p21, tako da uprkos povećanoj sintezi p21, on ne ostvaruje svoj efekat i slabo granulirani adenomi ostaju biološki agresivni. Druga mogućnost bi bila da p21 inicira epitelno-mezenhimalnu tranziciju, koja je opisana u ćelijskim kulturama fibroblasta i HR produkujućih adenoma (82, 83). Epitelno mezenhimalna tranzicija je jedan od momenata maligne alteracije i metastaziranja malignih tumora (82). Ipak, slabo granulirani HR produkujući adenomi su benigni tumori koji pokazuju agresivnije ponašanje, ali ne i sklonost ka metastaziranju. Iznad svega, nije uočena učestalija sklonost slabo granuliranih adenoma hipofize ka malignoj alteraciji (18, 27, 68, 84, 85). Najniže vrednosti p21 pozitivnih jedara su uočene kod TSH produkujućih adenoma, kod kojih su, prema našim saznanjima, po prvi put prikazane vrednosti procenata p21 pozitivnih jedara. TSH produkujući adenomi ponekad ispoljavaju agresivnije biološko ponašanje i u više od 95% pokazuju zadovoljavajući odgovor na terapiju somatostatinskim analogima (24, 78). Gonadotropni i null-cell adenomi su takođe pokazali u našem istraživanju niske vrednosti p21, koje su u skladu sa prethodnim istraživanjima (68). Naše istraživanje ukazuje da bi u budućim istraživanjima trebalo razmatrati nuklearnu p21 pozitivnost kao potencijalni

indikator agresivnog ponašanja, i kao prediktor odgovora na terapiju somatostatinskim analogima.

Citoplazmatska p21 pozitivnost je ispitivana u tkivima i organima u nešto manjem obimu nego nuklearna pozitivnost, budući da su prva saznanja o aktivnosti p21 bile vezane upravo za nukleus. Uočeno je da su funkcije p21 na citoplazmatskoj lokalizaciji kontradiktorne funkcijama na nuklearnoj lokalizaciji. Kada protein p21, nakon svoje sinteze u citoplazmi i finalne obrade u endoplazmatskom retikulumu ostane u citoplazmi (umesto da bude transportovan u jedro), on stimuliše apoptozu ćelija i dovodi do povećanja motiliteta ćelije (44, 46). Takođe je uočeno da maligni tumori koji pokazuju citoplazmatsku p21 pozitivnost su invazivniji i agresivniji (86). U našem istraživanju citoplazmatska p21 pozitivnost, procenjena citoplazmatskim skorom bojenja (CSB), je imala niske vrednosti u svim adenomima, sa maksimalnom vrednošću 3,5/12. Ove najviše vrednosti su uočene kod gonadotropnih adenoma, a pokazale su statistički značajno višu vrednost samo u odnosu na HR produkujuće adenome. Naši rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjem (68), gde su najviše vrednosti citoplazmatskog p21 bojenja uočene kod nefunkcionalnih adenoma hipofize, koje u najvećem procentu sačinjavaju gonadotropni adenomi. Međutim, naše istraživanje je u dijagnostičkom smislu preciznije, jer je, prema našim saznanjima, po prvi put ispitivana razlika citoplazmatske p21 pozitivnosti između gonadotropnih adenoma i null-cell adenoma hipofize, koji takođe spadaju u nefunkcionalne adenome. Interesantan je podatak da su null-cell adenomi pokazali niži CSB od gonadotropnih adenoma, što ukazuje da je citoplazmatska ekspresija p21 možda povezana sa produkcijom transkripcionog faktora SF-1 (87), koji imunohistohemijski vrši distinkciju između gonadotropnih i null-cell adenoma. Gonadotropne adenome, pored nefunkcionalnosti, karakteriše klinički, u najvećem broju slučajeva, neagresivan rast, tako da kod većine pacijenata ne dolazi do invazije kavernoznih sinusa (12, 88, 89). Zbog ovih karakteristika, gonadotropni adenomi najčešće imaju supraselarnu propagaciju (90). Sa stanovišta citoplazmatske p21 pozitivnosti, očekivali bismo u skladu sa literaturnim podacima, da gonadotropni adenomi pokazuju agresivnije ponašanje, budući da imaju najviše vrednosti CSB među adenomima hipofize. Ipak, čini se da je niska vrednost p21 CSB, sa maksimalnom vrednošću u

adenomima koja dostiže samo četvrtinu moguće maksimalne vrednosti, nije dostigla potencijalnu donju granicu koja je neophodna za razvoj pojačanog motiliteta ćelija. Najizraženiji p21 CSB uočen kod gonadotropnih adenoma bi se možda mogao dovesti u vezu sa činjenicom da oni većinom produkuju, ali ne i sekretuju svoje hormone (FSH i/ili LH). Drugim rečima, retencija hormona u citoplazmi bi možda mogla biti uzrok zadržavanja p21 u citoplazmi. U prilog ove hipoteze govore i istraživanja urađena većinom na ćelijskim kulturama, u kojima je zaključeno da je jedan od razloga retencije p21 u citoplazmi poremećaj ubikvitinacije ovog proteina (86, 91-94). Niži p21 CSB uočen kod null-cell adenoma bi govorio u prilog ove hipoteze, budući da null-cell adenomi ne sintetišu (samim tim i ne produkuju) hormone adenohipofize.

Vredno je pomena da su slabo i gusto granulirani HR produkujući adenomi, koji inače klinički pokazuju značajnu razliku u prezentaciji u smislu da su slabo granulirani adenomi značajno agresivnijeg biološkog ponašanja (19, 20, 75-77, 79-81), pokazali vrlo slične nivoe p21 CSB. Nameće se zaključak da je, potencijalno, agresivnije ponašanje kod tumora sa citoplazmatskom p21 ekspresijom, rezervisano samo za maligne tumore regija izvan hipofize, budući da u jedinom istraživanju citoplazmatske p21 pozitivnosti u karcinomima hipofize (68), na svega 6 slučajeva, skor bojenja bio niži nego u adenomima hipofize. Takođe se može pretpostaviti da citoplazmatski p21 kod benignih tumora, kao što su adenomi hipofize, ne deluje kao potencijalni marker invazivnosti.

Citoplazmatska p21 ekspresija, pored toga što je povezana sa povećanim motilitetom ćelije, povezana je i sa proapoptotskom aktivnošću (44). Budući da je ova aktivnost u kontradikciji sa povećanim motilitetom, postavlja se pitanje u kojim ćelijama se aktivira koja funkcija. Histološki gledano, apoptoza u adenomima hipofize je retka (21). Apoptotska aktivnost je nešto izraženija (do 2%) kod ACTH produkujućih adenoma (95). U našem istraživanju, p21 CSB ACTH produkujućih adenoma je bio oko 1, što je vrlo nisko. Ovaj rezultat nas navodi na zaključak da verovatno citoplazmatski p21 nije povezan sa povećanom apoptotskom aktivnošću ACTH produkujućih adenoma. Apoptotska aktivnost u adenomima hipofize je takođe uočena kao jedna od posledica tretmana tumora medikamentoznom terapijom (npr. dopaminski agonisti u tretmanu prolaktinoma) (96, 97).

Neki autori smatraju da je apoptotska aktivnost povezana sa agresivnošću adenoma hipofize (98). Apoptoza se kod adenoma hipofize sprovodi posredstvom bcl-2 i Bax proteina, pri čemu se njihova zastupljenost razlikuje u zavisnosti od funkcionalnosti: bcl-2 je u većem procentu prisutan kod nefunkcionalnih adenoma (86% prema 71.5%), dok je Bax prisutan kod svih funkcionalnih adenoma (100%) i svega 53.5% nefunkcionalnih adenoma (99). U našem istraživanju najviše (iako još niske) vrednosti p21 CSB su uočene kod gonadotrofnih adenoma, koji su u najvećem procentu slučajeva nefunkcionalni (11, 100). Ovaj rezultat bi se možda mogao tumačiti u svetlu vrlo niskih vrednosti p21 CSB u celom istraživanju, koje su potencijalno nedovoljne da bi pokrenule aktivnost citoplazmatski eksprimiranog p21.

P16 je inhibitor ciklin zavisne kinaze, koji dovodi do zastoja u kontrolnoj tački G1/S ćelijskog ciklusa (41). P16 dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa vezujući se za CZK4/6, koja reguliše fosforilaciju Rb proteina. Rb protein je aktivan u hipofosforilisanom stanju, kada vezuje transkripcioni faktor E2F. Porastom koncentracije p16, funkcija CZK4/6 je inhibirana, Rb protein ostaje u svojoj aktivnoj hipofosforilanoj formi, a transkripcioni faktor E2F ne može biti oslobođen (41). Budući da dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa, prepoznat je i u naučnoj praksi primenjen i kao marker senescencije (101). U našem istraživanju, statistički značajne razlike između podtipova adenoma hipofize po pitanju p16 nisu uočene. Štaviše, srednje vrednosti procenata p16 pozitivnih jedara su bile vrlo slične, sugerišući da ekspresija p16 u adenomima hipofize nije uslovljena produkcijom različitih hormona. Vredno je pomenuti i da podela grupe HR produkujućih adenoma na podtipove takođe nije dovela do statistički značajne razlike, što nas navodi na zaključak da ekspresija p16 nije uslovljena ni obrascem granuliranosti adenoma. Naši rezultati su saglasni sa rezultatima prethodne studije (68), koja je, za razliku od naše, obrađivala znatno manji uzorak od 40 adenoma hipofize, u kojoj je vršena procena procenata pozitivnih p16 jedara na 500 ćelija, u zoni celog preparata gde je koncentracija pozitivnih jedara bila najveća. Vrlo niske vrednosti p16 u adenomima hipofize bi, kao nezavisan podatak, ukazivale na sklonost ka povećanoj proliferativnoj aktivnosti i malignoj alteraciji, koja se kod adenoma veoma retko sreće. Neki benigni tumori sa vrlo niskom

incidencijom maligne alteracije, kao što su nevi kože, u visokom procentu eksprimiraju p16 (102). Ipak, pojedini maligni tumori, kao što su skvamocelularni karcinom grlića materice (103) i regije glave i vrata (104) se karakterišu intenzivnom i ekstenzivnom prebojenošću p16.

P16 je, pored toga što je marker senescencije, i marker starenja. Smatra se da se sa starenjem povećava i broj p16 pozitivnih ćelija u organizmu, koji, između ostalog, doprinosi smanjenoj sposobnosti ćelija tkiva da se dele u starosti (105, 106). U našem istraživanju su uočene statistički značajne razlike u starosti pacijenata sa različitim tipovima adenoma (pacijenti sa gonadotropnim adenomima su bili statistički značajno stariji od pacijenata sa HR, TSH i ACTH produkujućim adenomima). Međutim, budući da razlike nisu uočene i u ekspresiji p16 između adenoma hipofize, nameće se zaključak da, u adenomima hipofize, proces starenja pacijenta potencijalno nije povezan sa ekspresijom p16. Budući da prema našim saznanjima, do sad nije vršena komparacija razlika u starosti pacijenata i p16 ekspresije u adenomima hipofize, ovi podaci daju našem istraživanju poseban značaj.

SA- β -GAL je najčešće korišćeni marker senescencije, kako u ćelijskim kulturama, tako i u tkivu (62). Prema dostupnim literaturnim podacima, bojenje na SA- β -GAL je prvi put u ovom istraživanju urađeno novim, poliklonalnim antitelom na tkivu adenoma hipofize i tkivu adenohipofize. Naši rezultati bojenja se razlikuju od do sada objavljenih rezultata dva rada (68, 73). Naime, u našem istraživanju je imunohistohemijsko bojenje antitelom na SA- β -GAL bilo difuzno, sa malim varijacijama u intenzitetu, dok je u prethodnim istraživanjima bilo fokalno i/ili difuzno (68, 73). U prethodnim istraživanjima (68, 73) su takođe korišćena poliklonalna komercijalno dostupna antitela (Abcam), za koje ne postoji podatak o prečišćenosti. Međutim, antitelo kojim je rađeno naše istraživanje je prečišćeno, i, za sada, se koristi samo u istraživačke svrhe. β -galaktozidaza je lizosomalni enzim koji se detektuje u ćelijama sisara. U skladu sa kiselim sredinom organele u kojoj je lokalizovana, lizosomalna β -galaktozidaza pokazuje najveću aktivnost pri pH 4.0 i pH 4.5, dok je njena aktivnost značajno smanjena pri pH 6.0 (107). Zapravo, aktivnost β -galaktozidaze je nemerljiva u proliferišućim ćelijama prilikom *in situ* bojenja na x-galaktozidazu pri pH6,

što su uslovi u kojima se detektuje SA- β -GAL, iako je aktivnost lizosomalne β -galaktozidaze bila u normalnom opsegu pri kiselom pH. Ipak, nakon serije indirektnih fizioloških eksperimenata je predloženo da se povećana aktivnost lizosomalne- β -galaktozidaze tumači kao aktivnost SA- β -GAL (63). U prilog ovoj tvrdnji govori i činjenica da su vrednosti lizosomalne β -galaktozidaze bile značajno više u kasnijim pasažama ćelija u kulturi nego u ranijim pasažama, kako pri merenju na pH 4.5, tako i pri merenju na pH 6.0. Takođe je bitno napomenuti da su vrednosti β -galaktozidaze uvek bile više prilikom merenja na nižem pH nego pri višem (63, 108-110). Dalje, broj i veličina lizozoma se povećavala u ćelijama u kasnijim pasažama (111). Ova zapažanja ukazuju da aktivnost lizosomalne β -galaktozidaze raste u senescentnim ćelijama kao posledica povećanja njene količine u uvećanim lizozomima, što nadmašuje prag detekcije β -galaktozidaze, tako da ona postaje detektabilna i na suboptimalnom pH 6.0 (63, 109). Lee i saradnici su dokazali da je SA- β -GAL kodirana genom lizosomalne β -galaktozidaze, kao i da nivo lizosomalne β -galaktozidaze raste u procesu senescencije (62). U ovom istraživanju su prepoznate varijacije u bojenju antitelom na SA- β -GAL, a koje podržavaju lizosomalno poreklo enzima, kao i teoriju povećavanja broja i veličine lizozoma u procesu senescencije. Naime, unutar HR produkujućih adenoma, gde je imunohistohemijsko bojenje na SA- β -GAL bilo najintenzivnije, zapaženo je tačkasto (engl. „dot-like pattern“) bojenje, koje je nekada bilo u vidu jedne velike globule (mega-lizozom?), ili u vidu nekoliko manjih. Takođe, uočeni su i slučajevi kada je citoplazma ćelija adenoma ispunjena velikim brojem sitnih globula (lizozoma).

U našem istraživanju, najviše vrednosti SA- β -GAL su uočene kod HR produkujućih adenoma, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (68, 73). Budući da senescentne ćelije karakteriše odsustvo proliferativne aktivnosti, očekivali bismo da HR produkujući adenomi vrlo sporo rastu i da imaju neagresivno biološko ponašanje. Međutim, poznato je da, slabo i gusto granulirani adenomi pokazuju velike razlike u biološkom ponašanju: slabo granulirani se javljaju u mlađoj populaciji, agresivniji su, invazivniji i rezistentniji na terapiju somatostatinskim analogima. Gusto granulirani HR produkujući adenomi pokazuju potpuno suprotne karakteristike (20, 77, 79, 81). Podstaknuti ovim saznanjima, ispitali smo

SA- β -GAL aktivnost u ova dva tipa HR produkujućih adenoma. Gusto granulirani (klinički neagresivni) HR produkujći adenomi pokazali su statistički značajno intenzivnije SA- β -GAL bojenje od slabo granuliranih (klinički agresivnih) HR produkujćih adenoma, što ukazuje da bi agresivnost slabo granuliranih HR produkujćih adenoma mogla da bude uzrokovana aktivacijom senescencije. Prema našim saznanjima, analiza razlike intenziteta SA- β -GAL bojenja između slabo i gusto granuliranih HR produkujćih adenoma je urađena po prvi put, i daje našem istraživanju na značaju. Znajući da HR produkujće adenome karakteriše mogućnost da produkuj samo HR, ali da mogu i da produkuj i druge hormone (HR-PRL produkujći adenomi i plurihormonalni HR produkujći adenomi), izvršili smo podelu slabo i gusto granuliranih adenoma na isključivo HR produkujće, mešovite HR-PRL i plurihormonalne HR produkujće adenome. Zatim smo ispitali razliku između slabo i gusto granuliranih varijanti ovih adenoma. Statistički značajna razlika u intenzitetu SA- β -GAL bojenja između slabo i gusto granulirane varijante se zadržala samo kod adenoma koji produkuj samo HR, dok su vrednosti intenziteta SA- β -GAL bojenja bile vrlo slične kod mešovitih HR-PRL i plurihormonalnih HR adenoma. Ovi rezultati snažno podržavaju zaključak da dopunska produkcija hormona u HR produkujćim adenomima utiče na intenzitet SA- β -GAL bojenja, a samim tim i na aktivaciju senescencije. Međutim, postavlja se pitanje, da li ova „dopunska“ hormonska produkcija utiče i na aktivaciju senescencije i biološko ponašanje ovih adenoma. Činjenica je da se razlike u intenzitetu SA- β -GAL bojenja između mešovitih HR-PRL i plurihormonalnih HR produkujćih adenoma izjednačavaju, i to tako što se vrednosti kod slabo granuliranih adenoma povećavaju, a vrednosti gusto granuliranih smanjuju. Međutim, te vrednosti nikada ne dosežu niske vrednosti koje se sreću kod adenoma koji isključivo produkuj PRL, FSH i LH, tako da je za visok intenzitet bojenja na SA- β -GAL kod HR produkujćih adenoma ipak, najverovatnije odgovoran hormon rasta. Chesnokova i saradnici su nedavno dokazali da hormon rasta ima vrlo bitnu ulogu u aktivaciji senescencije, kako ćelija tumora hipofize, tako i drugih tumora (73). Pozitivna korelacija između količine HR u ćeliji i intenziteta SA- β -GAL bojenja je uočena u našem istraživanju. Naime, slabo granulirane HR produkujće adenome karakteriše oskudna (u neki slučajevima odsutna!) produkcija HR (112). Ovi adenomi u našem istraživanju su pokazivali izuzetno slab intenzitet SA- β -GAL bojenja. Za

razliku od slabo granuliranih, gusto granulirane HR produkujuće adenome karakteriše obilje hormona rasta u citoplazmi, što se podudara sa najintenzivnijim SA- β -GAL bojenjem u našem istraživanju. Treba istaći da SA- β -GAL, iako je najčešće korišćeni marker senescencije, nije direktno uključen u proces senescencije (62). Za razliku od njega, hormon rasta je direktno uključen u aktivaciju senescencije (73), tako da bi ga potencijalno, u budućim istraživanjima, trebalo koristiti kao marker senescencije.

ACTH produkujući adenomi se histološki dele na dva tipa: bazofilni adenomi i hromofobni adenomi (5, 113). Bazofilni adenomi su znatno češći i skoro uvek su mikroadenomi (21). Za razliku od njih, hromofobni ACTH produkujući adenomi su većinom makroadenomi i neretko su „nemi“, tj. ne sekretuju ACTH (114). U našem istraživanju, u grupi mikroadenoma se nalazilo svega dva ACTH produkujuća adenoma, dok su preostalih 21 bili makroadenomi. Budući da nam nije bio dostupan podatak o sekretornoj aktivnosti analiziranih adenoma hipofize, mogli bismo da pretpostavimo da su ovi ACTH produkujući makroadenomi hipofize bili potencijalno „nemi“. Poznato je da klinički „neme“ ACTH produkujuće adenomei hipofize karakteriše agresivniji rast, kao i rezistencija na aktuelne vidove terapije (114, 115). Naš podatak o najnižem intenzitetu bojenja na SA- β -GAL, i samim tim odsustvom aktivacije programa senescencije, bi se moglo, potencijalno, objasniti često agresivno kliničko ponašanje ovog podtipa adenoma.

Imunohistohemijsko bojenje antitelom Ki-67 (klon MIB-1) predstavlja neizostavni deo svakodnevne rutinske prakse u patologiji. Prema još aktuelnoj klasifikaciji SZO, proliferativni Ki-67 indeks veći od 3%, udružen sa difuznom prebojenošću jedara na p53 predstavlja kriterijum za dijagnozu atipičnog adenoma hipofize (5). Međutim, metodologija merenja proliferativnog Ki-67 indeksa nije precizno definisana, zbog čega su se brojni autori bavili ovom temom. Tako je Trouillas sačinila predlog nove, kliničko-patološke klasifikacije adenoma hipofize, gde predlaže procenu proliferativnog Ki-67 indeksa na 10 polja velikog uveličanja (PVU) koja su površine 0.30mm^2 (gde se očekuje oko 500 ćelija na PVU), u zonama najveće proliferativne aktivnosti tumora (eng. Hot spot activity). Trouillas smatra da donja granica za procenu agresivnijeg biološkog ponašanja adenoma hipofize za Ki-67 treba da ostane 3%, ali da ovom parametru treba pridružiti i druge, kao što je broj

mitoza i broj p53 pozitivnih jedara (13, 52). Chiloiro pak predlaže procenu proliferativnog Ki-67 ineksa na pet reprezentativnih zona, pri čemu se u svakoj zoni nalazi minimalno 1000 ćelija. Ona takođe smatra da je proliferativni Ki-67 indeks od izuzetnog značaja, ali da njegove vrednosti veće od 1.5% iziskuju intenzivnije praćenje pacijenta i naslućuju agresivnije ponašanje adenoma (116). Gejman i saradnici su procenu proliferativnog Ki-67 indeksa vršili na dva PVU, pri čemu su procenu vršili na 800-1500 ćelija (117). Međutim, činjenica da proliferativna aktivnost u adenomima hipofize, kao i većine endokrinih neoplazmi, može biti fokalnog karaktera dodatno otežava njenu procenu. Ova tvrdnja se naročito odnosi na one slučajeve kada je tkivo adenoma hipofize koje je dostavljeno na patohistološku analizu veoma oskudno. Dalje, heterogenost u proceni proliferativnog Ki-67 indeksa ne samo u adenomima hipofize potiče i od procene intenziteta bojenja, za koju je poznato da varira u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa u kojoj se ispitivana ćelija nalazi (53). U ovom istraživanju proliferativni Ki-67 indeks je procenjivan automatski, upotrebom softvera kome je predefinisano intenzitet bojenja jedara, a u cilju eliminisanja uticaja subjektivnog stava osobe koja procenjuje intenzitet bojenja. Minimalna površina za procenu proliferativnog Ki-67 indeksa je bila 1.13mm^2 , što je površina jednog cilindra TMN. Ova relativno mala površina predstavlja ograničavajući faktor, ali takođe može da predstavlja i površinu tkiva koja se neretko može sresti u svakodnevnoj praksi dijagnostike adenoma hipofize. Prednost metode procene proliferativnog Ki-67 indeksa koji je korišćen u ovom istraživanju je procena na celom dostupnom materijalu, nezavisno od „hot spot activity“. Međutim, budući da su cilindri TMN iz kalupa donora uzimani po principu slučajnosti, oni mogu, ali i ne moraju biti reprezentativni proliferativnog indeksa celog uzorka adenoma hipofize. U našem istraživanju svi tipovi adenoma hipofize su pokazali približno iste nivoe proliferativnog Ki-67 indeksa, pri čemu su vrednosti bile najviše u TSH, a najniže u gonadotropnim adenomima. Prema tome, saglasni smo sa prethodnim istraživanjima (5, 13) da visina proliferativnog Ki-67 indeksa nije zavisna od produkcije hormona adenoma hipofize.

Protein p53 je nazvan čuvarom genoma, budući da se ovaj protein sintetiše intenzivno nakon detekcije poremećaja i/ili promena DNK (51). Smatra se da je p53

zadužen za relativno brzu popravku oštećene DNK tako što zaustavlja ćelijski ciklus (118). Ukoliko ne dođe do popravke DNK, p53 inicira sintezu p21 koji nadalje zaustavlja ćelijski ciklus. Drugim rečima, dejstvo p53 je kratkoročno. Bojenje na p53 je uvedeno u klasifikaciju adenoma hipofize 2004 godine (5) sa ciljem postavljanja dijagnoze atipičnog adenoma. Autori kažu da atipične adenoma karakteriše „difuzna i intenzivna“ prebojenost jedara markerom p53, bez navođenja preciznog procenta obojenih jedara i načina na koji se vrši brojanje. Stoga je bojenje adenoma hipofize na p53 postalo predmet višegodišnje debate, a pojedini autori su ponudili svoje predloge i rešenja. Tako je Gejman (117) podelio analizirane adenome na one koji imaju više od 50% p53 pozitivnih jedara, manje od 50% pozitivnih jedara i one koji imaju retka razbacana p53 pozitivna jedra. Zaključio je da p53 nije povezan sa progresijom tumora. Trouillas je, u sklopu svog predloga nove klasifikacije adenoma hipofize, predložila daleko nižu granicu za proglašavanje adenoma hipofize p53 pozitivnim (13). Ona smatra da granica p53 pozitivnosti treba da bude 10 jasno i intenzivno pozitivnih jedara na 10 polja velikog uveličanja. Ovakav način procene p53 pozitivnih jedara dovodi u pitanje uzorkovanje adenoma hipofize. Naime, ukoliko je uzorak mali (što nekada može biti slučaj), fokus sa p53 pozitivnim jedrima može da bude izostavljen iz dijagnostičke procedure. Zato smo se mi odlučili da procenu broja p53 pozitivnih jedara uradimo na celom analiziranom uzorku (minimalno jedan cilindar prečnima 1.13mm²). Naši rezultati ukazuju da je procenat p53 pozitivnih jedara u svim tipovima adenoma hipofize izuzetno nizak, što je u skladu sa njihovim biološkim ponašanjem. Niske vrednosti p53 pozitivnih jedara kod HR produkujućih adenoma (naročito slabo granuliranog tipa) ukazuju da je mehanizam inhibicije ćelijskog ciklusa pomoću p53 prevaziđen, i da je tu ulogu, možda neuspešno, preuzeo nuklearni p21. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima grupe autora, koja zaključuje da p53 nije udružen sa invazivnošću HR produkujućih adenoma hipofize (119). Ipak, neki autori dovode u pitanje korišćenje p53 u dijagnostičke svrhe kod adenoma hipofize (120). Mi smatramo da je p53 koristan marker u dijagnostici adenoma hipofize, a donošenje konsenzusa o graničnim vrednostima ovog markera, kao i o klonu antitela koje se koristi predstavlja veliki izazov.

Jedan od prvih izazova unutar ovog istraživanja je bila procena razlika primenjenih markera između dve vrste kontrolnih grupa. Jedna kontrolna grupa je bila sačinjena od tkiva adenohipofize koje su akcidentalno bile uklonjene tokom hirurškog uklanjanja adenoma hipofize, dok je druga kontrolna grupa bila sačinjena od adenohipofize koje su prikupljene sa autopsija osoba kod kojih nisu evidentirana endokrinološka oboljenja. S obzirom da je statistički potvrđeno da su pripadnici autopsijske grupe bili značajno stariji od pripadnika biopsijske grupe, postavilo se pitanje da li će biti među njima i razlike u imunohistohemijskoj ekspresiji markera senescencije. Zaista, uočeno je da su vrednosti p16 i citoplazmatskog p21 statistički značajno više u autopsijskoj grupi. U prilog činjenici da je ova razlika uzrokovana starošću govori poređenje markera između jedinki istog uzrasta autopsijske i biopsijske grupe, koje je ostalo bez statističke značajnosti. Međutim, prilikom poslednjeg poređenja došli smo do vrlo interesantnog podatka, statistički značajne razlike po pitanju nuklearnog p21 između autopsijske i biopsijske grupe, u uzrasnoj grupi 51-60 godina. Iznenadujuće je što poređenjem dve grupe u celini, nismo došli do statistički značajne razlike, već samo do tendence ka višim vrednostima p21 u biopsijskoj grupi. Prilikom tumačenja ovih nalaza, uticaj adenoma hipofize na tkivo susedne, morfološki zdrave adenohipofize se ne može sa sigurnošću ni potvrditi niti negirati. Ipak, uticaj postmortalnih promena na ekspresiju markera p16, p21 i SA- β -GAL se sa velikom verovatnoćom može isključiti, budući da nije nađen statistički značajan stepen korelacije između PMI i analiziranih markera. U prilog ove činjenice govori i ispitivanje razlika između autopsijskih uzoraka adenohipofize koji su uzeti na autopsiji u intervalu kraćem od 12 sati nakon smrti i biopsijskih uzoraka, koje nije pokazalo statistički značajne razlike po pitanju ekspresije markera. Takođe, komparacija ekspresije p16, p21 i SA- β -GAL između autopsijskih uzoraka uzetih unutar 12 sati od smrtnog ishoda i onih koji su uzeti u intervalu dužem od 48 sati, nije pokazala statistički značajnu razliku, potkrepljujući činjenicu da PMI nema uticaja na ekspresiju analiziranih markera u tkivu adenohipofize.

Ključna uloga p16 i p21 u procesu senescencije, stanja ireverzibilnog zastoja ćelijskog ciklusa u G1 fazi, bez mogućnosti sinteze DNK kao odgovora na mitogene stimuluse, je prethodno dokazana u „in vitro“ i „in vivo“ modelima, kako tumorskih tako i

netumorskih ćelija (38, 121, 122). Senescencija je definisana kao fiziološki program terminalnog zastoja u rastu koji može da bude pokrenut promenama unutar telomera, ili drugim formama stresa. Senescencija može biti aktivirana nakon određenog broja deoba ćelija, što za posledicu ima progresivno skraćenje telomera, i tada se naziva replikativna senescencija. Sa druge strane, senescencija može biti indukovana i izlaganjem ćelija intenzivnom egzogenom stresu, kao što je aktivacija onkogeni, oštećenje DNK i oksidativni stres (123). Stiče se utisak da p16 i p21 imaju naizmenične uloge u nastanku senescencije, a da stepen aktivacije ovih CZK zavisi od vrste tkiva i ćelija koje se analiziraju (124). Sa druge strane, odnos senescencije i starenja nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da se broj senescentnih ćelija povećava tokom starenja (54, 55, 125). U prilog ove činjenice govore istraživanja u animalnom modelu koja navode da tokom starenja dolazi do akumulacije p16 unutar stem i progenitornih ćelija mozga, kosne srži i pankreasa (126-128). Na ovaj način bi se mogao, barem delimično, objasniti nastanak vrlo čestih degenerativnih oboljenja ovih organa čija se učestalost povećava sa starenjem, kao što su dijabetes melitus tip II, neurodegenerativne bolesti, kao i smanjenje celularnosti kosne srži tokom starenja. Budući da je u ovom istraživanju uočena statistički značajno veća ekspresija p16 u autopsijskom materijalu, nameće se zaključak da p16 i p21 u tkivu adenohipofize imaju nezavise uloge u procesu senescencije.

Interesantan i pomalo iznenađujući je nalaz da je citoplazmatska p21 pozitivnost bila statistički značajno veća u autopsijskoj grupi, pri čemu nije uočena statistički značajna korelacija između PMI i citoplazmatskog p21. Značajno je pomenuti da je vrednost p21 CSB bila niska u svim adenohipofizama, i da je u svim slučajevima bila fokalna, u vidu pojedinačnih razbacanih ćelija. Prema dostupnim podacima iz literature, citoplazmatska imunohistohemijska p21 pozitivnost je do sada opisivana samo u tumorskom tkivu, gde je prepoznata kao marker inhibicije apoptoze i povećane ćelijske migracije (44, 45, 48, 74). Iako p21 citoplazmatska pozitivnost do sada nije opisivana u netumorskom tkivu (129), Alexandraki i saradnici su opisali citoplazmatsku p21 pozitivnost u 1/7 analiziranih adenohipofiza, koje su bile deo hirurškog materijala. Postavlja se pitanje porekla akumulacije p21 u citoplazmi netumorskih ćelija. Mnogi autori smatraju da degradacija

proteina p21 omogućava progresiju ćelijskog ciklusa (91-94, 130). Protein p21 ima relativno kratko vreme poluživota. Degradira se dominantno u proteazomu ubikvitin zavisnim putem, mada je dokazano da degradacija može biti i ubikvitin-nezavisna (131). BAT3 protein je prepoznat kao glavni modulator proliferativne odnosno antiproliferativne aktivnosti proteina p21. BAT3 reguliše translokaciju proteina p21 iz citoplazme u jedro i obratno tokom ćelijskog ciklusa, modifikujući tako njegovu aktivnost. Međutim, tačna funkcija proteina p21 u citoplazmi ćelija adenohipofize je još uvek nepoznata.

Razlika u imunohistohemijskoj ekspresiji p16 i p21 između autopsijskih i biopsijskih uzoraka adenohipofize bi možda mogla da se objasni uticajem specifične mikrosredine susednog tumora – adenoma hipofize. Prema podacima iz savremene, nama dostupne literature, evidentirane su razlike u ekspresiji ova dva markera između adenohipofiza i adenoma hipofize, pri čemu je veličina uzoraka bila relativno mala. Tako je dokazano da pad u ekspresiji p16 predstavlja rani događaj u tumorigenezi adenoma hipofize, i da je podjednako bitan za progresiju tumora (132, 133). Smatra se da kod većine sisara dolazi do nakupljanja proteina p16 tokom starenja (41). Međutim, što se tiče tumorske patologije, situacija je drugačija: Seeman i saradnici su primetili da je nivo p16 u tkivu adenoma hipofize obrnuto proporcionalan starosti pacijenata (133). Takođe je uočeno da HR produkujući tumori pokazuju značajno viši nivo nuklearne p21 ekspresije u poređenju sa drugim podtipovima adenoma hipofize i tkivom adenohipofize. Lakostepeno povećanje procenata p21 pozitivnih jedara, bez dostizanja statističke značajnosti, koje je u našem relativno malom uzorku uočeno u biopsijskoj grupi adenohipofiza bi potencijalno moglo biti objašnjeno uticajem mikrosredine adenoma hipofize, budući da je većina (10/18, 55.56%) adenohipofiza bila izolovana upravo iz okoline HR produkujućih adenoma. Ovu našu pretpostavku potkrepljuje i činjenica da statistički značajno viši procenat p21 pozitivnih jedara, koji je uočen u biopsijskoj grupi prilikom poređenja ekspresije p21 i p16 između grupa pacijenata koji se nalaze u uzrasnoj grupi 51-60 godina. Naime, u pomenutoj biopsijskoj grupi, tri od četiri analizirane adenohipofize su se nalazile upravo pored HR produjukućeg adenoma.

Poznato je da postmortalne, autolitične promene pogađaju brojne proteine (134). Proces postmortalne autolize, a naročito njegova brzina, zavisi od okolne temperature, ishemijskih i zapaljenskih promena u tkivu, PMI, ali i od vrste tkiva (135). Osim toga, autoliza i degradacija biopsijskog materijala se odigrava u drugačijem okruženju u odnosu na autopsijski materijal, pa se samim tim očekuju i različite promene na nivou ekspresije proteina između ove dve vrste materijala (134, 136, 137). U ovom istraživanju nije uočena statistički značajna korelacija između PMI i imunohistohemijske ekspresije p21, p16 i SA- β -GAL. Ovo zapažanje je podržano odsustvom statistički značajne razlike u dopunskoj komparaciji navedenih markera između, sa jedne strane, autopsijske grupe sa $PMI \leq 12h$ i, sa druge strane, autopsijske grupe sa $PMI \geq 48h$ i biopsijske grupe. Osim toga, činjenica da proteini p16 i p21 pripadaju proteinima male molekulske mase (36, 134, 138) podržava naš stav da razlike u imunohistohemijskoj ekspresiji ovih proteina u biopsijskom i autopsijskom materijalu nisu uzrokovane postmortalnim autolitičnim promenama.

Imunohistohemijska ekspresija p16, p21 i SA- β -GAL u netumorskom humanom tkivu je ispitivana za veliki broj tkiva. Tako se nuklearna i citoplazmatska imunohistohemijska ekspresija p16 sreće u 18 od 80 tkiva, dominantno u limfnim čvorovima (139). Nuklearna imunohistohemijska p21 ekspresija je uočena kod 21 od 78 vrsta humanog tkiva, među kojima su najintenzivnije bila markirana jedra ćelija pločasto-slojevitog epitela, placente, dojke, nadbubrežne žlezde, creva i kosne srži (129). Prema dostupnim podacima iz literature, tkivo adenohipofize nije bilo obuhvaćeno ni jednim istraživanjem po pitanju imunohistohemijske ekspresije p16, p21 i SA- β -GAL, zbog čega su naši podaci od posebnog značaja.

P16 je inhibitor ciklin zavisne kinaze koji ima značajnu ulogu u inhibiciji ćelijskog ciklusa (112). Statistički značajno sniženje procenta p16 pozitivnih jedara kod adenoma hipofize, u odnosu na vrednosti u normalnoj hipofizi, je u skladu sa prethodnim istraživanjima (40, 68, 140). Brojna istraživanja su dokazala da je uzrok drastičnog pada količine p16 u adenomima hipofize hipermetilacija njegovog promotora (132, 141, 142), što govori u prilog činjenice da je glavna uloga p16 u adenomima hipofize upravo tumorigeneza. Ovaj rezultat nije u skladu sa očekivanjima, budući da je p16 jedan od

glavnih markera senescencije, a senescencija je predstavljena kao jedan od mogućih uzroka benignog ponašanja ovih tumora. Međutim, iako je p16 dominantan marker senescencije (143), on u adenomima hipofize ne igra tu ulogu, a senescencija u adenomima hipofize je najverovatnije pokrenuta drugim mehanizmima.

P21 na nuklearnoj lokalizaciji deluje kao moćan inhibitor ćelijskog ciklusa (47). Smatra se da bi ćelije koje pojačano ekspimiraju nuklearni p21 trebale da imaju sniženu proliferativnu aktivnost (144). U našem istraživanju su uočene statistički značajno niže vrednosti procenta p21 pozitivnih jedara u eksperimentalnoj grupi, u odnosu na kontrolnu grupu normalnih biopsijskih adenohipofiza, što nije u skladu sa prethodnim istraživanjem (68), gde su pokazane više vrednosti. Razlika u rezultatima bi se mogla objasniti razlikom u veličini ispitivanog uzorka, koji je u našem istraživanju bio oko deset puta veći. Sa druge strane, uočene su razlike u ekspresiji nuklearnog p21 među grupama adenoma hipofize, koja utiče na prosečnu vrednost p21 pozitivnih jedara. Procentualna zastupljenost adenoma hipofize u našem uzorku je u skladu sa incidencijom adenoma hipofize u hirurškim serijama (18), ali ne i u skladu sa opštom incidencijom (145), budući da se velika većina prolaktinoma u proteklih nekoliko decenija uspešno tretira dopaminskim agonistima (31). Statistički značajno niže vrednosti p21 pozitivnih jedara u odnosu na vrednosti u normalnoj hipofizi su uočene kod gonadotropnih i null-cell adenoma, što je u skladu sa prethodnim istraživanjem (68). Ovi rezultati ukazuju da su ekstremno retku malignu transformaciju gonadotropnih i null-cell adenoma zaduženi neki drugi regulacioni mehanizmi, u koje nije uključen p21. Najviše vrednosti p21 pozitivnih jedara, koje su uočene kod HR produkujućih adenoma, su i dalje niže nego u normalnoj hipofizi. Međutim, naše istraživanje nudi pomalo iznenađujući podatak da su jedino slabo granulrani HR produkujući adenomi pokazali više vrednosti procenta p21 pozitivnih jedara u odnosu na normalnu hipofizu, budući da slabo granulirane HR produkujuće adenome neretko karakteriše agresivno biološko ponašanje (19, 20, 75, 80), ali ne i veća sklonost ka malignoj alteraciji (27, 68, 84, 85). Prema tome, čini se da povećana aktivnost nuklearnog p21 ne inhibira invazivno biološko ponašanje slabo granuliranih HR produkujućih adenoma. Sa

druge strane, stiče se utisak da alteracija aktivnosti nuklearnog p21 ne utiče na učestalost maligne alteracije adenoma hipofize.

Citoplazmatska ekspresija p21 se povezuje sa povećanim motilitetom ćelija, kao i sa inhibicijom apoptoze (44, 47). Sve analizirane vrednosti p21 CSB u našem istraživanju su bile relativno niske. Statistički značajno niže vrednosti p21 CSB u adenomima hipofize u odnosu na normalnu adenohipofizu nisu u skladu sa prethodnim istraživanjem (68), gde su uočene više vrednosti p21 CSB u adenomima hipofize u odnosu na normalnu adenohipofizu, ali bez statističke značajnosti. Ove razlike bi se mogle objasniti značajno većim uzorkom u našem istraživanju u odnosu na prethodno (345 adenoma u našem istraživanju vs. 41 adenom u prethodnom), kao i većem broju adenohipofiza u našem istraživanju u odnosu na prethodno istraživanje (19 adenohipofiza u našem istraživanju vs. 7 u prethodnom). Razlika bi se dodatno mogla objasniti i različitim antitelima na p21 koja su korišćena (DAKO, clone CX-118 vs. Leica Microsystems, Newcastle, UK, clone 4D10). U našem istraživanju, statistički značajno niže vrednosti p21 CSB u odnosu na normalnu adenohipofizu su uočene kod prolaktinoma, TSH i HR produkujućih adenoma. Ovakav rezultat bi se potencijalno mogao objasniti zajedničkim poreklom ovih adenoma, koji je vezan za Pit-1 transkripcioni faktor. Ipak, u prethodnom istraživanju su vrednosti p21 CSB bile više kod prolaktinoma nego kod HR produkujućih adenoma, ali bez dostizanja statističke značajnosti (68). Ove razlike se takođe mogu objasniti brojem analiziranih HR produkujućih adenoma, koji je značajno bio veći u našoj kohorti.

Značajno intenzivnije bojenje na SA- β -GAL u grupi adenoma hipofize, u odnosu na intenzitet bojenja u adenohipofizi, sugerise da je u adenomima hipofize aktiviran program senescencije, i u skladu je sa prethodnim istraživanjem (68). Međutim, komparacijama intenziteta bojenja adenohipofize sa intenzitetom bojenja tipova adenoma hipofize, uočeno je da samo ACTH produkujući adenomi imaju statistički značajno slabiji intenzitet bojenja, a što bi se moglo dovesti u vezu sa njihovom agresivnošću (114) i što je već diskutovano u prethodnim pasusima. Jedina podgrupa adenoma hipofize koja je pokazala statistički značajno veći intenzitet bojenja u odnosu na normalnu adenohipofizu su bili gusto granulirani HR adenomi hipofize. Ovaj rezultat bi značio da je program senescencije

najintenzivnije aktiviran u ovom podtipu adenoma. Zaista, sa kliničke tačke gledišta, gusto granulirane adenome hipofize karakteriše neagresivno ponašanje (19, 20, 75, 79), što ukazuje da bi ono moglo biti objašnjeno aktivacijom senescencije.

Senescencija je ireverzibilni ulazak ćelije u G0 fazu, bez mogućnosti ponovnog ulaska u ćelijski ciklus pod uticajem faktora rasta i/ili proliferacije (54, 55, 125). Budući da još nije izolovan idealan marker senescencije, u cilju njenog prepoznavanja se koriste indirektni markeri, među kojima je najčešće korišćena SA- β -GAL, a pored nje i nuklearni p16 i p21 (54, 55, 125). Neki autori smatraju da je prvi indirektni pokazatelj senescencije vrlo nizak proliferativni indeks analiziranog tkiva, kao potvrda da se većina ćelija nalazi u G0 fazi ćelijskog ciklusa (55). Chesnokova i saradnici su nedavno pokazali da se hormon rasta može takođe smatrati markerom senescencije, budući da je direktno uključen u mehanizam nastanka senescencije (73). Senescencija se u tkivima prepoznaje prisustvom minimalno dva markera senescencije (55). Ukoliko bismo proliferativni Ki-67 indeks posmatrali kao jedan od markera senescencije, mogli bismo da zaključimo da je u adenomima hipofize, posmatranim kao jedna grupa prisutna aktivacija senescencije, budući da je u svim adenomima uočeno i statistički značajno intenzivnije bojenje na SA- β -GAL. Gledano iz perspektive tipova adenoma hipofize, jedini tip adenoma kod kojeg je uočeno više od dva markera senescencije su HR produkujući adenomi. Štaviše, kod ove grupe adenoma su bila prisutna 4 markera: Ki-67, HR, SA- β -GAL i nuklearni p21. Interesantno je naše zapažanje da, nakon podele HR produkujućih adenoma na slabo i gusto granulirane, dolazi do značajne razlike u ekspresiji ovih markera: gusto granulirane HR produkujuće adenome karakteriše prisustvo velike količine HR u citoplazmi, kao i SA- β -GAL, dok su vrednosti nuklearnog p21 veoma niske. Nasuprot njima, slabo granulirane HR produkujuće adenome karakteriše vrlo mala količina HR u citoplazmi, vrlo slabo bojenje na SA- β -GAL, ali i vrlo visoke vrednosti nuklearnog p21. Naši rezultati su u skladu sa prethodnim rezultatima Chesnokove i saradnika (73), koji su zaključili da postoji pozitivna korelacija između količine HR i SA- β -GAL u ćeliji. Međutim, ne podržavamo drugo istraživanje iste grupe istraživača (74), gde je uočena pozitivna korelacija ekspresije p21 i SA- β -GAL. Ova razlika u stanovištima bi se potencijalno mogla objasniti metodološkim razlikama, budući

da u navedenom radu nije napravljena distinkcija između citoplazmatske i nuklearne p21 pozitivnosti, a sama procena p21 pozitivnosti je bila semikvantitativna (za razliku od našeg rada, gde je kvantitativno naveden procenat p21 pozitivnih jedara). Dalje, smatramo da bi uzimanje u razmatranje nuklearne i citoplazmatske p21 pozitivnosti na isti način moglo dovesti do značajne greške u zaključivanju, budući da p21 u zavisnosti od lokalizacije (jedro vs. citoplazma) ima oprečne funkcije (44). Diskrepanca u ekspresiji SA- β -GAL i nuklearnog p21 između slabo i gusto granuliranih HR produkujućih adenoma, koja je uočena prema našim saznanjima po prvi put u literaturi, nema svoje precizno objašnjenje. Ona nas navodi na zaključak da je senescencija, u najužem smislu reči, prisutna kod gusto granuliranih HR produkujućih adenoma. Ovaj zaključak je i podržan i u najvećem broju slučajeva neagresivnim biološkim ponašanjem ovih adenoma (81). Sa druge strane, slabo granulirane adenome karakteriše vrlo agresivno biološko ponašanje (75), koje bi se moglo objasniti vrlo niskim vrednostima dva markera senescencije (male količine HR i SA- β -GAL u citoplazmi). Koegzistencija više od jednog markera senescencije nije uočena u preostalim tipovima adenoma hipofize, i u skladu je sa prethodnim istraživanjem (68). Gonadotropni i null-cel adenomi retko pokazuju agresivno biološko ponašanje (146), koje se ne bi moglo objasniti aktivacijom programa senescencije. Ovo istraživanje nas još jednom podseća i dokazuje da je heterogenost u biološkom ponašanju adenoma hipofize velika, i da je povezana sa produkcijom hormona.

Rekurentni adenomi hipofize se relativno često sreću u kliničkoj praksi. Razlog za njihovu rekurenciju se najčešće nalazi u nemogućnosti da tumor bude u celini uklonjen u prvom aktu. Međutim, rekurencija tumora se sreće i kod tumora koji su na kontrolnim snimcima NMR imponovali kao u celini odstranjeni (29, 147-150). Iako u dosadašnjim publikacijama nije dokazana razlika u pogledu morfologije i imunohistohemijske hormonske ekspresije rekurentnih adenoma hipofize u drugom operativnom aktu, promene na subcelularnom nivou su uočene. Tako su Turner i saradnici (37) opisali značajno viši nivo ekspresije ciklina B u rekurentnim nefunkcionalnim adenomima hipofize u odnosu na nivo u tkivu sa prve operacije. Ista grupa autora opisuje i značajno sniženje nivoa antiapoptotskog proteina bcl-2 u rekurentnim tumorima, što zajedno doprinosi višoj

proliferativnoj aktivnosti rekurentnih adenoma. Ricket i saradnici (151) su evidentirali povišen proliferativni Ki-67 indeks kod 10 rekurentnih adenoma hipofize u odnosu na nivo sa prve operacije. Pored toga, otkrili su i značajne hromozomske alteracije kod rekurentnih adenoma. Somatostatinski receptor 3 nije pokazao značajnu razliku u ekspresiji kod rekurentnih nefunkcionalnih adenoma hipofize (152). U ovom istraživanju smo želeli da ispitamo da li postoji statistički značajna razlika u imunohistohemijskoj ekspresiji markera ćelijskog ciklusa i senescencije kod rekurentnih adenoma hipofize u seriji od 19 pacijenata. Statistički značajna razlika je uočena samo u ekspresiji proliferativnog markera Ki-67, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (151). U našoj kohorti, u adenomima na ponovljenoj hirurškoj intervenciji, procenat p16 pozitivnih jedara je bio viši nego u na prvoj operaciji, ali bez dostizanja statističke značajnosti. Nivo p53 je takođe lakostepeno viši u rekurentnim tumorima, dok su vrednosti nuklearne i citoplazmatske p21 pozitivnosti u blagom padu. Iako rekurentni adenomi pokazuju značajno povišen proliferativni indeks, on se ne bi mogao objasniti inaktivacijom programa senescencije.

Iako su adenomi hipofize većinom benigne prirode, oni neretko invadiraju okolne strukture, kao što su kavernozi i sfenoidalni sinus, dok se supraselarna propagacija adenoma hipofize ne smatra invazivnošću (27, 153). Stopa invazije kavernozi sinusa od strane adenoma hipofize je 35%. Invazija dure se sreće u 64% do 85% analiziranih slučajeva (154). Makroadenomi imaju veću tendenciju ka invaziji nego mikroadenomi (146). Invazivni adenomi predstavljaju izazov za hirurško lečenje, budući da je kod njih većinom moguća samo parcijalna resekcija tumora, a komplikacije su znatno češće (155). Brojni biološki markeri su bili ispitivani u cilju otkrivanja prediktivnog markera invazivnosti. Međutim, ni jedan od njih, do sad, nije zadovoljio kriterijume (156). U ovom istraživanju je ispitivana razlika u ekspresiji markera p16, p21, SA- β -GAL, Ki-67 i p53 u odnosu na propagaciju adenoma hipofize. Podaci o pravcu propagacije, na osnovu NMR snimaka, su bili dostupni za 91 pacijenta. Budući da su podaci bili heterogeni, i da je bio prisutan veliki broj kombinacija propagacija, odlučili smo se da izvršimo grupisanje pravaca širenja u tri kategorije: supraselarno, supra/paraselarno i „ostalo“. Statistički značajna razlika je uočena samo u odnosu na već dobro poznati prognostički marker, Ki-67,

između grupe „ostalo“ i grupe sa supra/paraselarnim širenjem. P vrednost koja je blizu granice statističke značajnosti za citoplazmatski p21 između grupa supraselarno i „ostalo“, kao i za nuklearni p21 između grupa supraselarno i supra/paraselarno govore u prilog činjenice da se p21 ne bi mogao u potpunosti isključiti kao marker povezan sa propagacijom i invazivnošću adenoma hipofize. Naši rezultati po pitanju imunopozitivnosti p16, koja nije pokazivala statistički značajnu korelaciju sa propagacijom adenoma hipofize, su u skladu sa podacima iz literature (133). Ipak, za donošenje pouzdanih zaključaka neophodno je ispitivanje na većem uzorku pacijenata, u kojima bi bili praćeni svi pravci propagacije pojedinačno. Budući da nije uočena statistički značajna razlika i u druga dva od tri ispitivana markera senescencije, mogli bismo zaključiti da senescencija najverovatnije nije povezana sa propagacijom i invazivnošću adenoma hipofize.

Gojaznost se relativno često uočava kod pacijenata sa novootkrivenim adenomima hipofize, najčešće kod pacijenata sa prolaktinomima i ACTH produkujućim adenomima (157). Mehanizam nastanka gojaznosti u sklopu Kušingove bolesti je vrlo kompleksan. Smatra se da je za karakteristično prekomerno nakupljanje visceralnog masnog tkiva i njegov karakteristični gubitak na ekstremitetima odgovoran različit odgovor tkiva na hiperkortizolemiju. Različit odgovor tkiva je uslovljen brojem steroidnih receptora, kao i brojem i vrstom gena koje steroidni receptori kao transkripcioni faktori aktiviraju (158). U našem istraživanju statistički značajna korelacija sa ITM je uočena samo za citoplazmatsku p21 pozitivnost, i to sa relativno niskim stepenom korelacije. U prethodnim istraživanjima je uočeno da prognostički značaj p21 u adenokarcinomima kolona se menja u odnosu na ITM pacijenta (159). Poznato je da p21 ima bitnu ulogu u diferencijaciji i anti-apoptotskom efektu adipocita (160). Istraživanje u kome bi bili sagledani ITM zajedno sa markerima ćelijskog ciklusa u adenomima hipofize, prema našim saznanjima, do sad nije rađeno. U daljim istraživanjima bi trebalo ispitati povezanost p21 pozitivnosti sa odgovorima na medikamentoznu terapiju adenoma hipofize.

U ovom istraživanju, je uočen statistički značajno niži procenat p16 pozitivnih jedara kod mikroadenoma nego kod makroadenoma, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (133). Seeman i saradnici su pokazali da su adenomi hipofize koji su imali

abnormalnosti gena CDKN2A (u smislu metilacije ili delecije) bili veći od adenoma bez abnormalnosti gena (133). Metilacija gena CDKN2A, sa kojeg se transkribuje p16, je njegova najčešća modifikacija kod adenoma hipofize. Smatra se da opadanje nivoa p16 uzrokuje olakšani prelazak G1/S kontrolne tačke ćelijskog ciklusa, što za posledicu ima nekontrolisani rast adenoma hipofize. Ovaj stav podržava istraživanje u kome je utvrđena značajno viša stopa metilacije CDKN2A kod makroadenoma nego kod mikroadenoma. Iako vreme kada se odigrava metilacija CDKN2A tokom geneze adenoma hipofize nije precizno utvrđeno, njena uključenost u tumorigenezu i progresiju je višestruko dokazana (161). Poznato je da metilacija gena ima pozitivnu korelaciju sa uzrastom u netumorskom tkivu (162). Ipak, ovaj trend nije dokazan kod adenoma hipofize (161), i nije podržan od strane ovog istraživanja, budući da nije pokazan statistički značajan stepen korelacije između opadanja procenta p16 pozitivnih jedara i starosti pacijenata. Gigantski adenomi i makroadenomi se značajno razlikuju po pitanju ekspresije velikog broja gena, pri čemu ovi adenomi nisu pokazivali značajne razlike u morfologiji, imunohistohemijskoj ekspresiji hormona, niti u nivou Ki-67 i p53 (88, 90). Iako bi ova imunohistohemijska studija trebala da bude dopunjena ispitivanjem ekspresije navedenih gena na proteinskom nivou, ona nagoveštava značajne razlike u genezi makro i gigantskih adenoma. U našem istraživanju se trend opadanja procenta p16 pozitivnih jedara nije nastavio i na gigantske adenome, već je, naprotiv, prosečna vrednost u blagom porastu. Interesantan je i podatak da su i preostali analizirani markeri imali tendenciju porasta vrednosti u makro i gigantskim adenomima, ali bez statističke značajnosti. Ovakav nalaz potvrđuje spekulaciju da u genezi gigantskih adenoma, pored modifikacije CDKN2A i njegovog produkta, ulogu u enormnom rastu imaju kumulativni efekat modifikacije drugih gena. Međutim, još uvek je teško objasniti povezanost odsustva značajnog povećanja proliferativnog Ki-67 indeksa i p53 u gigantskim adenomima u odnosu na adenome manjih dimenzija, sa njihovim enormnim rastom.

P16 i p53 pripadaju različitim putevima aktivacije senescencije, pri čemu p16 igra bitnu ulogu u Rb putu, dok je p53 povezan sa aktivacijom p21 (39). U našem istraživanju je, iznenađujuće, pokazana pozitivna korelacija između p16 i p53, koja indirektno ukazuje na njihovu kooperaciju u adenomima hipofize. Pozitivna korelacija između p16 i p53 je već

opisana u literaturi, na modelu ćelijskih kultura (163). Sličnost ova dva markera u adenomima hipofize se ogleda i u tome da oba zadržavaju vrlo niske vrednosti u svim tipovima adenoma hipofize u našem istraživanju. Nameće se zaključak da je ova, pomalo neočekivana pozitivna korelacija, uslovljena i hormonskom aktivnošću adenoma.

Ki-67 i p53 su markeri koji se rutinski koriste u svakodnevnoj dijagnostici adenoma hipofize (5). Pozitivna korelacija ova dva markera uočena u našem istraživanju samo potvrđuje stavove da i u narednim klasifikacijama adenoma hipofize ova dva markera ne bi trebalo menjati, već samo potencijalno dopuniti novim (13, 52).

P21 na nuklearnoj lokalizaciji ima ulogu u inhibiciji ćelijskog ciklusa (44, 47), njegova citoplazmatska ekspresija je pokazatelj povećanog motiliteta ćelija i inhibitor apoptoze (44, 47), dok Ki-67 (klon MIB-1) markira jedra svih onih ćelija koje nisu u G0 fazi ćelijskog ciklusa. Statistički značajna pozitivna korelacija je uočena između procenata Ki-67 pozitivnih jedara i p21 ekspresije na obe lokalizacije u našem istraživanju, a ovaj rezultat je potvrđen i statistički značajnom korelacijom između nuklearne i citoplazmatske p21 ekspresije. Naši rezultati nisu u skladu sa prethodnim istraživanjima, gde nije uočena statistički značajna korelacija između oba tipa bojenja p21 i Ki-67 (164), odnosno, gde je uočena statistički značajna negativna korelacija između citoplazmatske p21 ekspresije i Ki-67 (68). Ovakva heterogenost u rezultatima bi se mogla objasniti metodološkim razlikama (brojanje procenta Ki-67 pozitivnih jedara na 500 odnosno 1000 ćelija u prethodnim radovima vs. brojanje na celom uzorku u našem istraživanju). Heterogenost u rezultatima nam sugeriše da bi bilo poželjno uključiti dopunske metode analize, u cilju verifikacije ovih rezultata, koji su relativno retko obrađeni u literaturi.

Poznato je da je sinteza p21 u najvećem procentu uslovljena prethodnom sintezom i aktivacijom p53 (47, 50, 51), a što je potvrđeno statistički značajnom pozitivnom korelacijom u tkivu adenoma hipofize u našem istraživanju.

SA- β -GAL je najčešće korišćen marker senescencije, koji u zavisnosti od tkiva na kome je primenjeno pokazuje različite korelacije sa drugim markerima senescencije (54, 55, 125). U našem istraživanju je uočena statistički značajna pozitivna korelacija sa nuklearnim p21 i p16, i negativna korelacija sa citoplazmatskim p21. Za razliku od našeg

istraživanja, Alexandraki i saradnici (68) nisu uočili statistički značajnu korelaciju SA- β -GAL sa p16 i p21. Chesnokova i saradnici su uočili pozitivnu korelaciju između p21 (ne precizirajući da li se radi o nuklearnoj i/ili citoplazmatskoj ekspresiji) sa SA- β -GAL, ali samo kod HR produkujućih adenoma, dok se ispitivanje korelacija u našem istraživanju odnosilo da celu kohortu adenoma hipofize. I ovde se razlike u rezultatima mogu objasniti korišćenjem različitih antitela, različitom metodologijom i različitom veličinom i sastavom kohorte adenoma hipofize. Takođe, ovi heterogeni rezultati iziskuju dopunska istraživanja, zasnovana na primeni drugih, pre svega molekularnih metoda istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

1. Gubitak aktivnosti p16 ima značajan uticaj na proces tumorigeneze u adenomima hipofize, što potvrđuje manji procenat ekspresije p16 u adenomima u odnosu na normalnu hipofizu, kao i u mikroadenomima u odnosu na makroadenome.
2. P16 nije uključen u aktivaciju programa senescencije kod adenoma hipofize.
3. Različite lokalizacije, nuklearne i citoplazmatske, ekspresije p21 odgovaraju različitim ulogama koje ovaj protein obavlja u procesima tumorigeneze i senescencije kod adenoma hipofize.
4. Ekspresija SA- β -GAL u ćelijama adenoma hipofize ukazuje na aktivaciju senescencije u ovim tumorima, što je potvrđeno intenzivnijom prebojenošću u tumorskim ćelijama u odnosu na normalno tkivo adenohipofize.
5. Nuklearna ekspresija p21 i citoplazmatska ekspresija SA- β -GAL zavise od hormonske produkcije, podtipa adenoma i obrasca granularnosti. Najveći procenat p21 pozitivnih jedara, kao i najslabiji intenzitet SA- β -GAL uočeni su kod slabo granuliranih HR produkujućih adenoma, što je u skladu sa njihovim biološkim ponašanjem.
6. Statistički značajna korelacija između citoplazmatske p21 ekspresije i ITM, koja je po prvi put uočena u ovom istraživanju, sugerise da bi ova povezanost mogla biti od prediktivnog značaja.
7. Veća vrednost proliferativnog Ki-67 indeksa u adenomima hipofize sa supra i paraselarnom propagacijom u odnosu na adenome čija je propagacija bila u drugim smerovima ukazuje da je proliferativna aktivnost potencijalno uslovljena/udružena sa nekim drugim faktorima koji doprinose invazivnosti adenoma, a da to nisu inhibitori ciklin zavisnih kinaza.

8. Uočene statistički značajne korelacije između p16 i p21, sa jedne strane i p53 i Ki-67 sa druge strane, koje nisu u potpunosti u skladu sa prethodnim istraživanjima, ukazuju na potrebu za dopunom istraživanja drugim metodama.

Dalja istraživanja bi trebalo sprovesti u smeru ispitivanja korelacije egzaktne veličine tumora i aktivacije senescencije, kao i ispitivanje korelacije terapijskog odgovora pacijenata sa aktivacijom senescencije. Takođe bi bilo poželjno uraditi istraživanje sa novim markerima senescencije, kao i ispitivanje na svežem tkivu, u cilju verifikacije rezultata dobijenih u ovom istraživanju.

7. LITERATURA

1. Kato K, Saeki N, Yamaura A. Morphological changes on MR imaging of the normal pituitary gland related to age and sex: main emphasis on pubescent females. *J Clin Neurosci*. 2002;9(1):53-6.
2. Tsunoda A, Okuda O, Sato K. MR height of the pituitary gland as a function of age and sex: especially physiological hypertrophy in adolescence and in climacterium. *Am J Neuroradiol*. 1997;18(3):551-4.
3. Musumeci G, Castorina S, Castrogiovanni P, Loreto C, Leonardi R, Aiello FC, et al. A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. *Acta Histochem*. 2015;117(4-5):355-66.
4. Hong GK, Payne SC, Jane JA, Jr. Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. *Otolaryngol Clin North Am*. 2016;49(1):21-32.
5. DeLellis RA. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press; 2004. 320 p. p.
6. Al-Brahim NY, Asa SL. My approach to pathology of the pituitary gland. *J Clin Pathol*. 2006;59(12):1245-53.
7. Zhang J, Pickering CR, Holst CR, Gauthier ML, Tlsty TD. p16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Research*. 2006;66(21):10325-31.
8. Esteves C, Neves C, Augusto L, Menezes J, Pereira J, Bernardes I, et al. Pituitary incidentalomas: analysis of a neuroradiological cohort. *Pituitary*. 2015; 18(6):777-81
9. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004;101(3):613-9.
10. Lafferty AR, Chrousos GP. Pituitary tumors in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(12):4317-23.
11. Mayson SE, Snyder PJ. Silent (clinically nonfunctioning) pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2014;117(3):429-36.
12. Cooper O, Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(4):447-60.

13. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathologica*. 2013;126(1):123-35.
14. Raverot G, Jouanneau E, Trouillas J. Management of endocrine disease: clinicopathological classification and molecular markers of pituitary tumours for personalized therapeutic strategies. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2014;170(4):R121-32.
15. Hardy J, Vezina JL. Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasm. *Adv Neurol*. 1976;15:261-73.
16. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery*. 1993;33(4):610-7; discussion 7-8.
17. Edal AL, Skjodt K, Nepper-Rasmussen HJ. SIPAP--a new MR classification for pituitary adenomas. Suprasellar, infrasellar, parasellar, anterior and posterior. *Acta Radiol*. 1997;38(1):30-6.
18. Saeger W, Ludecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2007;156(2):203-16.
19. Obari A, Sano T, Ohyama K, Kudo E, Qian ZR, Yoneda A, et al. Clinicopathological features of growth hormone-producing pituitary adenomas: difference among various types defined by cytokeratin distribution pattern including a transitional form. *Endocrine Pathology*. 2008;19(2):82-91.
20. Mayr B, Buslei R, Theodoropoulou M, Stalla GK, Buchfelder M, Schofl C. Molecular and functional properties of densely and sparsely granulated GH-producing pituitary adenomas. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2013;169(4):391-400.
21. Asa SL. Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know? *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(8):1231-40.

22. Molitch ME. Medical management of prolactin-secreting pituitary adenomas. *Pituitary*. 2002;5(2):55-65.
23. Perry A, Brat DJ. *Practical surgical neuropathology a diagnostic approach*. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2010.
24. Beck-Peccoz P, Persani L, Mannavola D, Campi I. Pituitary tumours: TSH-secreting adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(5):597-606.
25. Balogun JA, Monsalves E, Juraschka K, Parvez K, Kucharczyk W, Mete O, et al. Null Cell Adenomas of the Pituitary Gland: an Institutional Review of Their Clinical Imaging and Behavioral Characteristics. *Endocrine Pathology*. 2014.
26. Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ER, Jr. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *J Neurosurg*. 2011;114(2):336-44.
27. Sav A, Rotondo F, Syro LV, Di Ieva A, Cusimano MD, Kovacs K. Invasive, Atypical and Aggressive Pituitary Adenomas and Carcinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(1):99-104.
28. Gardner DG, Shoback DM, Greenspan FS. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011. xiii, 880 p. p.
29. Katznelson L, Laws ER, Jr., Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):3933-51.
30. Chinezu L, Jouanneau E, Vasiljevic A, Trouillas J, Raverot G. Silent GH pituitary tumor: diagnostic and therapeutic challenges. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2013;74(5-6):491-5.
31. Klibanski A. Clinical practice. Prolactinomas. *N Engl J Med*. 2010;362(13):1219-26.
32. Shimon I, Bronstein MD, Shapiro J, Tsvetov G, Benbassat C, Barkan A. Women with prolactinomas presented at the postmenopausal period. *Endocrine*. 2014;47(3):889-94.
33. Prague JK, May S, Whitelaw BC. Cushing's syndrome. *BMJ*. 2013;346:f945.
34. Quereda V, Malumbres M. Cell cycle control of pituitary development and disease. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2009;42(2):75-86.

35. Fedele M, Fusco A. Role of the high mobility group A proteins in the regulation of pituitary cell cycle. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010;44(6):309-18.
36. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704-7.
37. Turner HE, Nagy Z, Sullivan N, Esiri MM, Wass JA. Expression analysis of cyclins in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;53(3):337-44.
38. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593-602.
39. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol*. 2000;35(3):317-29.
40. Ogino A, Yoshino A, Katayama Y, Watanabe T, Ota T, Komine C, et al. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2005;64(5):398-403.
41. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*. 2012;130(8):1715-25.
42. Sawicka M, Pawlikowski J, Wilson S, Ferdinando D, Wu H, Adams PD, et al. The specificity and patterns of staining in human cells and tissues of p16INK4a antibodies demonstrate variant antigen binding. *PLoS One*. 2013;8(1):e53313.
43. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75(4):817-25.
44. Cmielova J, Rezacova M. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112(12):3502-6.
45. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res*. 2010;704(1-3):12-20.
46. Romanov VS, Pospelov VA, Pospelova TV. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;77(6):575-84.

47. Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Current Opinion in Oncology*. 2013;25(1):52-8.
48. Huang Y, Wang W, Chen Y, Huang Y, Zhang J, He S, et al. The opposite prognostic significance of nuclear and cytoplasmic p21 expression in resectable gastric cancer patients. *J Gastroenterol*. 2013.
49. Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):11-23.
50. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 2006;13(6):1027-36.
51. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(4):275-83.
52. Trouillas J. In search of a prognostic classification of endocrine pituitary tumors. *Endocrine Pathology*. 2014;25(2):124-32.
53. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;182(3):311-22.
54. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005;120(4):513-22.
55. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705.
56. Hayflick L. Human cells and aging. *Sci Am*. 1968;218(3):32-7.
57. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, et al. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 1999;18(34):4808-18.
58. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, et al. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1135-42.
59. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444(7119):633-7.

60. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol.* 2010;6:347.
61. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(20):9363-7.
62. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 2006;5(2):187-95.
63. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 20):3613-22.
64. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine.* 1998;4(7):844-7.
65. Kampf C, Olsson I, Ryberg U, Sjostedt E, Ponten F. Production of tissue microarrays, immunohistochemistry staining and digitalization within the human protein atlas. *J Vis Exp.* 2012(63).
66. Wang SL, Yang CH, Chen HH, Chai CY. A simple and economical method for the manual construction of well-aligned tissue arrays. *Pathology, Research and Practice.* 2006;202(6):485-6.
67. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
68. Alexandraki KI, Munayem Khan M, Chahal HS, Dalantaeva NS, Trivellin G, Berney DM, et al. Oncogene-induced senescence in pituitary adenomas and carcinomas. *Hormones (Athens, Greece).* 2012;11(3):297-307.
69. Ferreira JE, de Mello PA, de Magalhaes AV, Botelho CH, Naves LA, Nose V, et al. Non-functioning pituitary adenomas: clinical features and immunohistochemistry. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63(4):1070-8.

70. Thodou E, Kontogeorgos G, Theodossiou D, Pateraki M. Mapping of somatostatin receptor types in GH or/and PRL producing pituitary adenomas. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):274-9.
71. Ramirez C, Cheng S, Vargas G, Asa SL, Ezzat S, Gonzalez B, et al. Expression of Ki-67, PTTG1, FGFR4, and SSTR 2, 3, and 5 in nonfunctioning pituitary adenomas: a high throughput TMA, immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(5):1745-51.
72. Casar-Borota O, Fougner SL, Bollerslev J, Nesland JM. KIT protein expression and mutational status of KIT gene in pituitary adenomas. *Virchows Arch.* 2012;460(2):171-81.
73. Chesnokova V, Zhou C, Ben-Shlomo A, Zonis S, Tani Y, Ren SG, et al. Growth hormone is a cellular senescence target in pituitary and nonpituitary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(35):E3331-9.
74. Chesnokova V, Zonis S, Kovacs K, Ben-Shlomo A, Wawrowsky K, Bannykh S, et al. p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(45):17498-503.
75. Bakhtiar Y, Hirano H, Arita K, Yunoue S, Fujio S, Tominaga A, et al. Relationship between cytokeratin staining patterns and clinico-pathological features in somatotropinoma. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* 2010;163(4):531-9.
76. Bhayana S, Booth GL, Asa SL, Kovacs K, Ezzat S. The implication of somatotroph adenoma phenotype to somatostatin analog responsiveness in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6290-5.
77. Brzana J, Yedinak CG, Gultekin SH, Delashaw JB, Fleseriu M. Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience. *Pituitary.* 2013;16(4):490-8.
78. Chinezu L, Vasiljevic A, Jouanneau E, Francois P, Borda A, Trouillas J, et al. Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies. *Human Pathology.* 2014;45(1):71-7.

79. Fougner SL, Casar-Borota O, Heck A, Berg JP, Bollerslev J. Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(1):96-102.
80. Kiseljak-Vassiliades K, Shafi S, Kerr JM, Phang TL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Wierman ME. Clinical implications of growth hormone-secreting tumor subtypes. *Endocrine*. 2012;42(1):18-28.
81. Larkin S, Reddy R, Karavitaki N, Cudlip S, Wass J, Ansorge O. Granulation pattern, but not GSP or GHR mutation, is associated with clinical characteristics in somatostatin-naive patients with somatotroph adenomas. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2013;168(4):491-9.
82. Laberge RM, Awad P, Campisi J, Desprez PY. Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron*. 2012;5(1):39-44.
83. Lekva T, Berg JP, Heck A, Lyngvi Fougner S, Olstad OK, Ringstad G, et al. Attenuated RORC expression in the presence of EMT progression in somatotroph adenomas following treatment with somatostatin analogs is associated with poor clinical recovery. *PLoS One*. 2013;8(6):e66927.
84. Pernicone PJ, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Young WF, Jr., et al. Pituitary carcinoma: a clinicopathologic study of 15 cases. *Cancer*. 1997;79(4):804-12.
85. Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, et al. Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery*. 2006;59(2):341-53; discussion -53.
86. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 2001;3(3):245-52.
87. Schimmer BP, White PC. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol*. 2010;24(7):1322-37.
88. Chacko G, Chacko AG, Lombardero M, Mani S, Seshadri MS, Kovacs K, et al. Clinicopathologic correlates of giant pituitary adenomas. *J Clin Neurosci*. 2009;16(5):660-5.

89. Galland F, Lacroix L, Saulnier P, Dessen P, Meduri G, Bernier M, et al. Differential gene expression profiles of invasive and non-invasive non-functioning pituitary adenomas based on microarray analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(2):361-71.
90. Madsen H, Borges TM, Knox AJ, Michaelis KA, Xu M, Lillehei KO, et al. Giant pituitary adenomas: pathologic-radiographic correlations and lack of role for p53 and MIB-1 labeling. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(8):1204-13.
91. Abbas T, Sivaprasad U, Terai K, Amador V, Pagano M, Dutta A. PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev*. 2008;22(18):2496-506.
92. Amador V, Ge S, Santamaria PG, Guardavaccaro D, Pagano M. APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell*. 2007;27(3):462-73.
93. Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25752-7.
94. Kim Y, Starostina NG, Kipreos ET. The CRL4Cdt2 ubiquitin ligase targets the degradation of p21Cip1 to control replication licensing. *Genes Dev*. 2008;22(18):2507-19.
95. Messini I, Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Smyth HS. Pituitary corticotroph adenoma containing many apoptotic cells: a histologic, immunohistochemical, ultrastructural and molecular study. *Ultrastruct Pathol*. 2002;26(1):27-32.
96. Kontogeorgos G, Horvath E, Kovacs K, Coire C, Lloyd RV, Scheithauer BW, et al. Morphologic changes of prolactin-producing pituitary adenomas after short treatment with dopamine agonists. *Acta Neuropathologica*. 2006;111(1):46-52.
97. Stefaneanu L, Kovacs K, Scheithauer BW, Kontogeorgos G, Riehle DL, Sebo TJ, et al. Effect of Dopamine Agonists on Lactotroph Adenomas of the Human Pituitary. *Endocrine Pathology*. 2000;11(4):341-52.
98. LaPak KM, Burd CE. The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging. *Mol Cancer Res*. 2014;12(2):167-83.
99. Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. *Pituitary*. 2003;6(3):127-33.

100. Ntali G, Capatina C, Grossman A, Karavitaki N. Clinical review: Functioning gonadotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(12):4423-33.
101. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res.* 2012;111(1):97-109.
102. Chandeck C, Mooi WJ. Oncogene-induced cellular senescence. *Adv Anat Pathol.* 2010;17(1):42-8.
103. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. The clinical impact of using p16(INK4a) immunocytochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *International Journal of Cancer.* 2015;136(12):2741-51.
104. Gronhoj Larsen C, Gyldenlove M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, et al. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1587-94.
105. Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews.* 2011;10(1):146-52.
106. Tsygankov D, Liu Y, Sanoff HK, Sharpless NE, Elston TC. A quantitative model for age-dependent expression of the p16INK4a tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(39):16562-7.
107. Zhang S, McCarter JD, Okamura-Oho Y, Yaghi F, Hinek A, Withers SG, et al. Kinetic mechanism and characterization of human beta-galactosidase precursor secreted by permanently transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem J.* 1994;304 (Pt 1):281-8.
108. Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, Ffrench M. Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol.* 2003;38(8):887-95.
109. Gary RK, Kindell SM. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal Biochem.* 2005;343(2):329-34.
110. Yang NC, Hu ML. The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol.* 2005;40(10):813-9.

111. Brunk U, Ericsson JL, Ponten J, Westermark B. Residual bodies and "aging" in cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of confluence. *Exp Cell Res.* 1973;79(1):1-14.
112. Musat M, Vax VV, Borboli N, Gueorguiev M, Bonner S, Korbonits M, et al. Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Front Horm Res.* 2004;32:34-62.
113. Syro LV, Rotondo F, Cusimano MD, Di Ieva A, Horvath E, Restrepo LM, et al. Current status on histological classification in Cushing's disease. *Pituitary.* 2015;18(2):217-24.
114. Cooper O. Silent corticotroph adenomas. *Pituitary.* 2015;18(2):225-31.
115. Liubinas SV, Porto LD, Kaye AH. Management of recurrent Cushing's disease. *J Clin Neurosci.* 2011;18(1):7-12.
116. Chiloiro S, Bianchi A, Doglietto F, de Waure C, Giampietro A, Fusco A, et al. Radically resected pituitary adenomas: prognostic role of Ki 67 labeling index in a monocentric retrospective series and literature review. *Pituitary.* 2014;17(3):267-76.
117. Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Human Pathology.* 2008;39(5):758-66.
118. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(22):7475-84.
119. Yarman S, Kurtulmus N, Canbolat A, Bayindir C, Bilgic B, Ince N. Expression of Ki-67, p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) concomitantly in growth hormone-secreting pituitary adenomas; which one has a role in tumor behavior ? *Neuro Endocrinol Lett.* 2010;31(6):823-8.
120. Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(7):423-35.
121. Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, Yoshimoto S, Tajima T, Yamakoshi K, et al. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Research.* 2010;70(22):9381-90.

122. Querada V, Martinalbo J, Dubus P, Carnero A, Malumbres M. Genetic cooperation between p21Cip1 and INK4 inhibitors in cellular senescence and tumor suppression. *Oncogene*. 2007;26(55):7665-74.
123. Tominaga K, Pereira-Smith OM. The role of chromatin reorganization in the process of cellular senescence. *Current Drug Targets*. 2012;13(13):1593-602.
124. Herbig U, Sedivy JM. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(1):16-24.
125. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(9):729-40.
126. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, et al. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 2006;443(7110):421-6.
127. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 2006;443(7110):453-7.
128. Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, et al. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 2006;443(7110):448-52.
129. Atlas HP. CDKN1A 2014 [November 3, 2014]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000124762/antibody>.
130. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell*. 2003;115(1):71-82.
131. Lu Z, Hunter T. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(12):2342-52.
132. Farrell WE, Clayton RN. Epigenetic change in pituitary tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10(2):323-30.
133. Seemann N, Kuhn D, Wrocklage C, Keyvani K, Hackl W, Buchfelder M, et al. CDKN2A/p16 inactivation is related to pituitary adenoma type and size. *The Journal of Pathology*. 2001;193(4):491-7.

134. Poloz YO, O'Day DH. Determining time of death: temperature-dependent postmortem changes in calcineurin A, MARCKS, CaMKII, and protein phosphatase 2A in mouse. *International Journal of Legal Medicine*. 2009;123(4):305-14.
135. Li J, Kil C, Considine K, Smarkucki B, Stankewich MC, Balgley B, et al. Intrinsic indicators for specimen degradation. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2013;93(2):242-53.
136. Mertins P, Yang F, Liu T, Mani DR, Petyuk VA, Gillette MA, et al. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. 2014;13(7):1690-704.
137. Wunderer F, Kuhne S, Jilg A, Ackermann K, Sebesteny T, Maronde E, et al. Clock gene expression in the human pituitary gland. *Endocrinology*. 2013;154(6):2046-57.
138. Feuerstein N, Ali IU. Comparative analysis of p21 proteins from various cell types by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1985;29(3):253-63.
139. Human Protein Atlas. CDKN2A 2014 [November 3, 2014.]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000147889/antibody>.
140. Lee EH, Kim KH, Kwon JH, Kim HD, Kim YZ. Results of immunohistochemical staining of cell-cycle regulators: the prediction of recurrence of functioning pituitary adenoma. *World Neurosurg*. 2014;81(3-4):563-75.
141. Farrell WE. Pituitary tumours: findings from whole genome analyses. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(3):707-16.
142. Farrell WE. Epigenetics of pituitary tumours: an update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(4):299-305.
143. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436(7051):642.
144. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993;366(6456):701-4.
145. Aflorei ED, Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2014;117(3):379-94.

146. Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER, Jr., Randall RV. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J Neurosurg.* 1986;65(6):733-44.
147. Giustina A, Chanson P, Kleinberg D, Bronstein MD, Clemmons DR, Klibanski A, et al. Expert consensus document: A consensus on the medical treatment of acromegaly. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(4):243-8.
148. Yamada S, Fukuhara N, Oyama K, Takeshita A, Takeuchi Y. Repeat transsphenoidal surgery for the treatment of remaining or recurring pituitary tumors in acromegaly. *Neurosurgery.* 2010;67(4):949-56.
149. Kurosaki M, Luedecke DK, Abe T. Effectiveness of secondary transnasal surgery in GH-secreting pituitary macroadenomas. *Endocr J.* 2003;50(5):635-42.
150. Bodhinayake I, Ottenhausen M, Mooney MA, Kesavabhotla K, Christos P, Schwarz JT, et al. Results and risk factors for recurrence following endoscopic endonasal transsphenoidal surgery for pituitary adenoma. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014;119:75-9.
151. Rickert CH, Dockhorn-Dworniczak B, Busch G, Moskopp D, Albert FK, Rama B, et al. Increased chromosomal imbalances in recurrent pituitary adenomas. *Acta Neuropathologica.* 2001;102(6):615-20.
152. Lee M, Lupp A, Mendoza N, Martin N, Beschorner R, Honegger J, et al. SSTR3 is a putative target for the medical treatment of gonadotroph adenomas of the pituitary. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(1):111-9.
153. Fahlbusch R, Buslei R. The WHO classification of pituitary tumours: a combined neurosurgical and neuropathological view. *Acta neuropathologica.* 2006;111(1):86-7.
154. Daita G, Yonemasu Y. Dural invasion and proliferative potential of pituitary adenomas. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1996;36(4):211-4.
155. Berker M, Hazer DB, Yucel T, Gurlek A, Cila A, Aldur M, et al. Complications of endoscopic surgery of the pituitary adenomas: analysis of 570 patients and review of the literature. *Pituitary.* 2012;15(3):288-300.
156. Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (Part II). *Neurosurgery.* 2010;67(6):1790-8; discussion 8.

157. Schmid C, Goede DL, Hauser RS, Brandle M. Increased prevalence of high Body Mass Index in patients presenting with pituitary tumours: severe obesity in patients with macroprolactinoma. *Swiss Med Wkly*. 2006;136(15-16):254-8.
158. Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):473-81.
159. Ogino S, Nosho K, Shima K, Baba Y, Irahara N, Kirkner GJ, et al. p21 expression in colon cancer and modifying effects of patient age and body mass index on prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(9):2513-21.
160. Inoue N, Yahagi N, Yamamoto T, Ishikawa M, Watanabe K, Matsuzaka T, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2008;283(30):21220-9.
161. Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. *PLoS One*. 2013;8(12):e82619.
162. So K, Tamura G, Honda T, Homma N, Waki T, Togawa N, et al. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci*. 2006;97(11):1155-8.
163. Sharpless NE, Alson S, Chan S, Silver DP, Castrillon DH, DePinho RA. p16(INK4a) and p53 deficiency cooperate in tumorigenesis. *Cancer Research*. 2002;62(10):2761-5.
164. Hiyama H, Kubo O, Kawamata T, Ishizaki R, Hori T. Expression of cyclin kinase inhibitor p21/WAF1 protein in pituitary adenomas: correlations with endocrine activity, but not cell proliferation. *Acta Neurochir (Wien)*. 2002;144(5):481-8.

BIOGRAFIJA

Dr Emilija Manojlović Gačić je rođena 1979. godine u Beogradu. Završila je osnovnu školu „Đura Jakšić“ i Treću beogradsku gimnaziju kao nosilac Vukove diplome. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1998, a završila 2004. godine, sa prosečnom ocenom 9.49. Od 2005. godine je zaposlena na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u zvanju asistenta. Akademsku specijalizaciju iz oblasti „Embriologija, histologija, histochemija i elektronska mikroskopija“ završila je odbranivši završni rad pod nazivom „Histološke, imunohistochemijske i molekularno-genetske karakteristike malignih glioma“, a mentor je bila Prof. dr Milica Skender-Gazibara. Specijalizaciju iz Patološke anatomije je završila 2011. godine, nakon čega se posvetila daljem stručnom usavršavanju. Najuža oblast njenog rada i interesovanja je neuropatologija, sa posebnim akcentom na patologiju hipofize. Svoje usavršavanje iz oblasti patologije hipofize je započela pohađanjem kursa „EUROPIT“ 2012 godine u Annecy (Francuska), a nastavila 2013. godine u Lionu (Francuska) kod Prof. Jacqueline Trouillas i 2014. godine u Uppsali (Švedska) kod dr Olivere Časar-Borote.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Emilija Manojlović Gačić

broj upisa 08-DS-MM-13

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

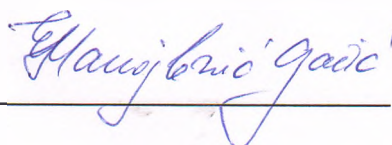
Imunohistohemijska analiza regulatornih proteina ćelijskog ciklusa i proliferativnog

Ki-67 (MIB-1) indeksa u adenomima hipofize

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.02.2016.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Emilija Manojlović Gačić

Broj upisa: 08-DS-MM-13

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: Imunohistohemijska analiza regulatornih proteina ćelijskog ciklusa i proliferativnog Ki-67 (MIB-1) indeksa u adenomima hipofize

Mentor: Prof. dr Milica Skender Gazibara

Potpisani: Emilija Manojlović Gačić

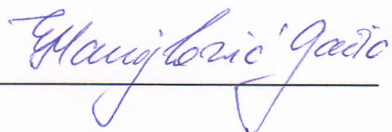
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.02.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Imunohistohemijska analiza regulatornih proteina ćelijskog ciklusa i proliferativnog

Ki-67 (MIB-1) indeksa u adenomima hipofize

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.02.2016.

