

آدنوم غیر فعال هیپوفیز: مطالعه کلینیکوپاتولوژی از ۸۵ مورد

دکتر علی مهتا^۱، دکتر وحید حق پناه^۱، دکتر آناهیتا لشکری^۱، دکتر رامین حشمت^۲، دکتر باقر لاریجانی^۳،
دکتر سید محمد توانگر^۴

^۱ پزشک مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۲ اپیدمیولوژیست مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۳ استاد مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۴ دانشیار بخش پاتولوژی، بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی نویسنده مسئول: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، دکتر سید محمد توانگر.

E-mail: emrc@sina.tums.ac.ir

وصول: ۸۵/۳/۱۸، اصلاح: ۸۵/۴/۲۹، پذیرش: ۸۵/۶/۷

چکیده

زمینه و هدف: آن دسته از آدنوم‌های هیپوفیز که فاقد علائم بالینی ناشی از افزایش ترشح هورمون‌های هیپوفیز قدامی باشند، تحت عنوان "آدنوم غیرفعال هیپوفیز" نامیده می‌شوند. این تومورها حدود یک چهارم تومورهای هیپوفیزی را شامل می‌شوند. بهترین راه شناسایی این تومورها استفاده از روش‌های ایمنونوهیستوشیمی است. Ki-67 یک آنتی‌ژن هسته سلول است که توسط آنتی‌بادی مونوکلونال MIB-1 شناسایی می‌شود و ضریب نشانگذاری آن (MIB-1 LI) به عنوان علامت تکثیر سلولی در شرایط عادی و غیرعادی تلقی می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کلینیکوپاتولوژی، نمونه پاتولوژی ۸۵ بیمار مبتلا به آدنوم غیرفعال هیپوفیز که مورد عمل جراحی قرار گرفته‌اند مورد مطالعه ایمنونوهیستوشیمی قرار گرفت.

یافته‌ها: در کلیه نمونه‌های پاتولوژی این ۸۵ بیمار، MIB-1 LI اندازه‌گیری شد که فقط در ۵ مورد بالاتر از ۵ درصد بود. به علاوه، ۱۸ مورد به یک یا دو هورمون هیپوفیز قدامی واکنش نشان دادند.

نتیجه‌گیری: از لحاظ پاتولوژی، آدنوم‌های غیرفعال هیپوفیز، شامل انواع متفاوتی از تومورها می‌باشند که برخی از آن‌ها، پتانسیل تولید هورمون دارند اما نقایص احتمالی در مسیر ترشح هورمون، ممکن است سبب عدم افزایش سطح هورمون‌های آدنوهیپوفیز در خون و ایجاد سندرم‌های ناشی از آن شود. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۳/ شماره ۲/ صص ۱۰۴-۹۹).

واژه‌های کلیدی: آدنوم غیرفعال هیپوفیز؛ ایمنونوهیستوشیمی؛ MIB-1 LI

مقدمه

لحاظ آندوکرینولوژی خاموش بوده و تظاهر بالینی آن‌ها به علت اثر فشاری ناشی از اندازه تومور است. برخی از نشانه‌های ناشی از کاهش هورمون‌های هیپوفیز قدامی

آدنوم‌های غیرفعال هیپوفیز در حدود یک چهارم کل تومورهای هیپوفیز را تشکیل می‌دهند. این تومورها از

را به‌طور مؤثر ترشح نمی‌کنند و لذا می‌توانند در گروه آدنوم‌های غیرفعال هیپوفیز قرار گیرند (۱۱-۶).

Ki-67 یک آنتی‌ژن اختصاصی چرخه سلولی در هسته می‌باشد که توسط آنتی‌بادی مونوکلونال MIB-1 به راحتی قابل شناسایی می‌باشد و ضریب نشان‌گذاری آن می‌تواند به عنوان شاخص تکثیر تومور تلقی شود (۱۲ و ۱۶).

MIB-1LI یک معیار مفید در جهت تعیین فعالیت تکثیری و تهاجمی آدنوم‌های هیپوفیز قدامی می‌باشد (۱۲ و ۱۵). اما برخی مطالعات نشان می‌دهند که بین عود آدنوم‌های غیرفعال هیپوفیز و یا عدم عود آن‌ها و MIB-1LI رابطه‌ای قابل توجه به لحاظ آماری وجود ندارد (۱۷ و ۲۰).

در این مطالعه هدف این بود که با کمک روش‌های ایمونوهیستوشیمی، آدنوم فعال و غیرفعال هیپوفیز را از یکدیگر تفکیک شوند تا بدین طریق درک بهتری از ماهیت این آدنوم‌ها به دست آید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی می‌باشد. جمعیت آماری ۱۰۷ بیمار مبتلا به آدنوم غیرفعال هیپوفیز که بین سال‌های ۱۳۵۳ تا ۱۳۸۰ در بیمارستان دکتر شریعتی تهران تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند. براساس تعریف، آدنوم غیرفعال هیپوفیز شامل آن دسته از تومورهای هیپوفیز می‌باشد که علائم بالینی ناشی از افزایش سطح خونی هورمون‌های هیپوفیز قدامی نظیر آکرومگالی، کوشینگ، تیروتوکسیکوز و یا سندرم آمنوره-گالاکتوره در بیمار وجود نداشته باشد، همچنین سطح پرولاکتین خون بیمار قبل از عمل جراحی باید کمتر از ۲۰۰ ng/ml بوده و نیز سطح خونی سایر هورمون‌های هیپوفیزی نباید بالا باشد.

از میان ۱۰۷ بیمار مبتلا به آدنوم غیرفعال هیپوفیز، مدارک پزشکی ۸۵ بیمار (۶۱ مرد و ۲۴ زن) در دسترس بود. سن این بیماران از ۱۴ تا ۶۶ سال (متوسط ۴۱/۵۶)

مانند سردرد و اختلالات بینایی، در هنگام مراجعه بیماران دیده می‌شوند (۱،۲). افزایش خفیف تا متوسط سطح پرولاکتین خون ($>200\text{ ng/ml}$) ناشی از اثر فشاری برساقه هیپوفیز ممکن است مشاهده شود اما سطح پرولاکتین بالاتر از ۲۰۰ ng/ml قویاً به نفع تومور ترشح‌کننده پرولاکتین می‌باشد (۳).

ایمونوهیستوشیمی، یک روش استاندارد ارزشمند جهت طبقه‌بندی آدنوم‌های هیپوفیز است. این روش باعث ایجاد طبقه‌بندی جدید این تومورها شده است که ارتباط ساختار و عملکرد تومور و نیز سیتوژنز و بیولوژی تومور را مشخص می‌کند (۴). ایمونوهیستوشیمی، محصولات ژن سلول هیپوفیز را در دو سطح میکروسکوپ نوری و الکترونی مشخص می‌کند و باعث ایجاد طبقه‌بندی جدید تومورها بر اساس عملکرد آن‌ها می‌شود (۵).

به‌طور کلی با کمک ایمونوهیستوشیمی می‌توان هورمون‌های هیپوفیزی مرتبط با ریونوکلئیک اسید پیغام بر (MRNA) را به کمک روش آنالیز Northern از مواد استخراج شده از کل بافت و یا در سطح یک سلول منفرد با استفاده از شیوه‌های هیبریدیزاسیون درجا *in situ* اندازه‌گیری کرد.

به استثنای یک زیر واحد گلیکوپروتئینی، اگر بیش از ۵ درصد سلول‌های تشکیل‌دهنده تومور از لحاظ ایمونوهیستوشیمی مثبت باشند، معمولاً بیانگر افزایش سطح خونی آن هورمون است. تعیین کمی شدت رنگ پذیری ایمونوهیستوشیمی به صورت ذهنی است و مقیاس شدت آن بر اساس توصیف میزان رنگ پذیری است که آیا تعداد کم، پراکنده و یا اغلب سلول‌های تومور چقدر پروتئین قابل یافتن توسط ایمونوهیستوشیمی را بروز می‌دهند.

تومورهای سلول گنادوتروف، برخلاف تومورهای کورتیکوتروف، سوماتوتروف، لاکتوتروف و تیروتروف که هورمون‌های مربوطه را ترشح می‌کنند، معمولاً خاموش هستند و تومورهای گنادوتروف پروتئین محصول ژن خود

بالینی، مشکلات بینایی به صورت کاهش حدت بینایی (۹۱/۸ درصد)، تاری دید (۷۷/۶ درصد) و نقص میدان بینایی در پری متری (۵۱/۸ درصد) بود. علاوه بر این، سردرد شکایت شایعی بوده است (۶۱/۲ درصد) (جدول ۱).

بر اساس تقسیم‌بندی هیستوپاتولوژی، اکثر موارد آدنوم‌های هیپوفیز که بر اساس مطالعه با میکروسکوپ نوری از نمونه‌های پاتولوژی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین - ائوزین به‌دست آمده بود را آدنوم کروموفوب تشکیل داد و فقط تعداد کمی به صورت آدنوم‌های کروموفوب - ائوزینوفیل یا کروموفوب - بازوفیل بودند. در دو مورد نیز آدنوم مهاجم با دست‌اندازی به سینوس کاورنوس مشاهده شد.

جدول ۱: علائم بالینی ۸۵ بیمار مبتلا به آدنوم غیرفعال هیپوفیز (NFPA)

علائم یا نشانه‌ها	تعداد	درصد
کاهش حدت بینایی	۷۸	۹۱/۸
تاری دید	۶۶	۷۷/۶
نقص میدان بینایی	۴۴	۵۱/۸
همی انوبی دو طرفه تمپورال	۳۰	۳۵/۳
همی انوبی یک طرفه تمپورال	۱۱	۱۲/۹
اتروفی اپتیک	۱۶	۱۸/۸
فلج عصب زوج ۳	۱	۱/۲
فلج عصب زوج ۷	۲	۲/۳
سردرد	۵۲	۶۱/۲
تهوع، استفراغ	۱۲	۱۴/۲
هیپوتیروئیدیسم	۴	۴/۷
ناتوانی جنسی	۷	۸/۲

با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی، تمام نمونه‌های پاتولوژی با هر ۶ هورمون هیپوفیز قدامی رنگ‌آمیزی شدند. ۶۷ مورد از ۸۵ نمونه مورد بررسی (۷۸/۸ درصد) به هیچ یک از این ۶ هورمون واکنش نشان ندادند. لذا تشخیص آدنوم "null cell" برای این بیماران مطرح شد. از ۱۸ مورد باقیمانده (۲۱/۲ درصد)، ۱۳ مورد

(سال) بوده است. پرونده این بیماران از نظر تظاهرات بالینی و بررسی آزمایشگاهی سطح هورمون‌ها، مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های پاتولوژی با کمک شیوه‌های رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مورد مطالعه بافت‌شناسی قرار گرفت. هر نمونه با هر یک از ۶ هورمون هیپوفیز قدامی (پرولاکتین، هورمون رشد، کورتیکوتروپین، TSH، FSH و LH) جهت تعیین فنوتیپ هورمونی، آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده در خرگوش در رقت‌های مقابل مورد استفاده قرار گرفت: $\frac{1}{1000}$ برای پرولاکتین، $\frac{1}{7000}$ برای هورمون رشد، $\frac{1}{2000}$ برای کورتیکوتروپین، $\frac{1}{2000}$ برای تیروتروپین، $\frac{1}{3000}$ برای FSH و $\frac{1}{1000}$ برای LH (Dakopatts, Santa Barbara, "CA, VSA") (۱۴).

بلوک‌های پاراتینه پاتولوژی نمونه‌های حاصل از عمل در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد و درون آنتی‌بادی MIB-1 (Immunotech، ماری، فرانسه) در طول شب قرار داده شدند تا آنتی‌ژن ki-67 مورد شناسایی قرار گیرد (۱۴). سه منطقه (نقاط داغ) از مناطق با حداکثر غلظت هسته‌های مثبت با MIB-1 انتخاب شده و در بزرگنمایی بالا (400X) با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. هر منطقه حدود ۷۰۰ تا ۱۰۰۰ سلول برحسب میزان سلولی نمونه تومور داشت. مناطق نکروز، سلول‌های نرمال هیپوفیزی و سلول‌های آندوتلیال از بررسی حذف شدند. با در نظر گرفتن ۱۰۰۰ سلول با روش شمارش دستی، MIB-1LI بر اساس درصد سلول‌های MIB-1 مثبت تعیین شد (رسوب قهوه‌ای فشرده محدود به هسته سلول).

یافته‌ها

سن بیماران بین ۱۴ تا ۶۶ سال بود (متوسط ۴۱/۶ سال). از لحاظ نسبت جنسی، ۶۱ نفر مرد (۷۱/۸ درصد) و ۲۴ نفر زن (۲۸/۲ درصد) بودند. شایع‌ترین تظاهر

نسبت به یک هورمون و ۵ مورد نسبت به دو هورمون واکنش نشان دادند (جدول ۲).

با به کارگیری آنتی‌بادی مونوکلونال MIB-1 بر کلیه نمونه‌های پاتولوژی جهت بررسی آنتی‌ژن ki-67 مشخص شد که تنها در ۵ مورد از ۸۵ بیمار (۵/۹ درصد)، MIB-1LI بیش از ۵ درصد بود که از آن‌ها دو مورد آدنوم غیرفعال مهاجم با MIB-1LI، ۵۰ الی ۶۰ درصد و ۳۰ الی

جدول ۲: فنوتیپ هورمونی در ۱۸ بیمار مبتلا به آدنوم غیرفعال هیپوفیزی

هورمون	درصد مثبت بودن (تعداد)	فراوانی
GH	۵-۱۰ درصد	۱
	۱۰-۱۵ درصد	۱
	۲۰-۲۵ درصد	۱
	۳۰ درصد	۱
	۳۰-۴۰ درصد	۱
PRL	۵-۱۰ درصد	۱
	۱۰-۱۵ درصد	۲
	۲۰-۲۵ درصد	۱
GH, PRL	۱۰-۱۵ درصد، ۵-۱۰ درصد	۱
	۱۵-۲۰ درصد، ۲۰-۱۵ درصد	۱
درصد		
ACTH	۱۰ درصد	۱
FSH	۵-۱۰ درصد	۱
	۱۰-۱۵ درصد	۱
	۲۰-۲۵ درصد	۱
FSH, LH	۵-۱۰ درصد، ۵-۱۰ درصد	۲
	۱۰ درصد، ۱۰ درصد	۱

۴۰ درصد بودند. در سه مورد دیگر MIB-1LI بین ۵ تا ۱۰ درصد بود. کلیه این ۵ مورد، آدنوم "null cell" بودند (۳ مرد و ۲ زن، میانگین سن: ۲۹/۸ سال). در بقیه ۸۰ مورد متوسط MIB-1LI، ۱/۵ درصد بود.

در کلیه بیماران تشخیص نورورادیولوژی آدنوم هیپوفیز با کمک CT اسکن یا کنتراست و MRI مسجل شد. در ۲۲ مورد (۲۵/۹ درصد)، ماکروآدنوم هیپوفیز (>10 mm) با گسترش به ناحیه سوپراسلار وجود داشت

(تومور دمبلی شکل شامل دو قسمت اینتراسلار و سوپراسلار). تهاجم به سینوس کاورنوس در دو مورد آدنوم غیرفعال مهاجم وجود داشت. در ۶۱ بیمار باقیمانده (۷۱/۸ درصد)، ماکروآدنوم هیپوفیز بدون گسترش قابل توجه به ناحیه سوپراسلار تشخیص داده شد.

از ۸۵ بیمار مبتلا به آدنوم غیرفعال هیپوفیز، ۲۲ نفر (۲۵/۹ درصد) تحت عمل جراحی کرانیوتومی ساب فرونتال با برداشتن کامل و یا نزدیک به کامل تومور قرار گرفتند (شامل دو مورد آدنوم مهاجم و ۴ مورد از ۵ بیمار آدنوم غیرفعال GH مثبت) سایر ۶۳ بیمار (۷۴/۱ درصد) تحت عمل جراحی ترانس اسفنوییدال قرار گرفتند.

اگر چه یافته‌های پیگیری بیماران کامل نبود، اما اغلب بیماران بیش از ۵ سال مورد پیگیری قرار گرفتند که تنها دو مورد عود تومور یافت شد که هر دو GH مثبت بودند (یکی ۱۰ الی ۱۵ درصد و دیگری ۳۰ درصد) و MIB-1LI در هر دو کمتر از ۵ درصد بود. این دو بیمار در ابتدا تحت عمل جراحی میکروسکوپی ترانس-اسفنوییدال قرار گرفتند اما پس از عود، عمل کرانیوتومی انجام شد.

بحث

در بیماران مبتلا به آدنوم غیرفعال هیپوفیز که مورد مطالعه قرار گرفتند، از نظر توزیع جنسی، مردان ارجحیت قابل ملاحظه‌ای داشتند (نسبت مرد به زن؛ ۲/۵۵). میندرمن و ویلسون نسبت جنسی انواع تومورهای هیپوفیز را بر اساس فنوتیپ بالینی آن‌ها مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که آدنوم‌های ترشح کننده ACTH و TSH عمدتاً در زنان و آدنوم‌های ترشح کننده GH و نیز آدنوم‌های غیرفعال عمدتاً در مردان بروز می‌یابند (۲۱).

گلکوفسکی و همکاران در مطالعه‌ای که از ۵۴ بیمار مبتلا به آدنوم هیپوفیز به عمل آوردند، دریافتند که در ۳۴ مورد رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی هورمون‌ها مثبت بود اما سطح سرمی آن هورمون در بیمار بالا نبود

MIB-1LI فقط در ۵ مورد (۵/۹ درصد) بیش از ۵ درصد بود که در دو مورد آنها تهاجم قابل توجه به ساختار پاراسلار و سینوس کاورنوس وجود داشت که در آنها شیوع MIB-1LI به ترتیب ۵۰ الی ۶۰ درصد و ۳۰ الی ۴۰ درصد بود اما پس از ۵ سال پیگیری، عود نکردند. آنتی ژن ki-67 نشانگر وضعیت تومور در زمان تکثیر می‌باشد. این آنتی ژن با نشانه‌گذاری تیمیدین و تعیین فلوسیتومتری فاز S قویاً ارتباط دارد (۲۴).

در ابتدا تمایز بین آدنوم‌های فعال و غیرفعال هیپوفیز، کاملاً بالینی بود. در تقسیم‌بندی جدید آدنوم‌های هیپوفیز، علاوه بر یافته‌های بالینی، آزمایشگاهی، رادیولوژی و بافت‌شناسی، باید ویژگی‌های ایمونوهیستوشیمی و فراساختاری سلول‌های تومور مورد نظر قرار گیرد. مطالعه دقیق پاتولوژی با کمک روش‌های ایمونوهیستوشیمی که امروزه در کلیه موارد آدنوم‌های هیپوفیز انجام می‌شود باعث درک بهتری از ماهیت این تومورها و شناخت درمان مناسب آن‌ها می‌شود.

(۲۲). بنابراین، مثبت بودن رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در آدنوم هیپوفیز، گاهی با افزایش سطح سرم آن هورمون ارتباطی ندارد. همان‌طور که ذکر شد در ۱۸ مورد از ۸۵ بیمار مورد مطالعه (۲۱/۲ درصد)، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با یک یا دو هورمون در بیش از ۵ درصد سلول‌های نمونه پاتولوژی، مثبت بود در حالی که سطح سرمی هورمون‌ها در بیماران طبیعی بود. در این میان، دو مورد GH مثبت وجود داشت که در یکی ۳۰ درصد سلول‌ها و در دیگری ۳۰ الی ۴۰ درصد سلول‌ها مثبت بودند اما هیچ اثری از آکرومگالی وجود نداشت. در چهار مورد فقط پرولاکتین مثبت شد که شاید پرولاکتینوما با سطح پایین پرولاکتین سرم بوده است یعنی درست همانند دو موردی که توسط شوفل و همکاران (۲۳) گزارش شده است. آدنوم گنادوتروف خاموش در ۶ مورد (۷/۱ درصد) گزارش شد و برخلاف آنچه در مطالعات قبلی آمده است (۲،۱۱)، درصد بالایی نبود. به هرحال ۶۷ بیمار (۷۸/۸ درصد) واقعاً آدنوم "null cell" بودند که به هیچ یک از ۶ هورمون آدنوهیپوفیزی واکنش نشان ندادند.

References

1. Thapar K, Kovacs K, Tumour of the sellar region. In DD, McLendon RE, Bruner JM Russel and Rubinstein's pathology of tumours of the nervous system Williams & Wilkins. 1998: 561-677
2. Losa M, Mortini P, Barzaghi R, Franzin A, Giovanelli M. Endocrine inactive and gonadotroph adenomas: diagnosis and management. J Neurooncol. 2001;54(2):167-77
3. Delgrange E, Trouillas J, Maiter D, Donckier J, Tourniaire J. . Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(7):2102-7
4. Kovacs K, Horvath E. Tumours of the pituitary gland. Atlas of tumour pathology. 1986. pp.1-269.
5. Kovacs K, Horvath E, Stefaneanu L, Bilbao J, Singer W, Muller PJ. Pituitary adenoma producing growth hormone and adrenocorticotropin: a histological, immunocytochemical, electron microscopic, and situ hybridization study. Case report. J Neurosurg . 1998 ;88(6):1111-5
6. Mukherjee JJ, Islam N, Kaltsas G, Lowe DG, Charlesworth M, Afshar F, , et al. Clinical radiological and pathological features of patients with Rathke's cleft cysts: tumours that may recur. J Clin Endocrinol Metab. 1997 ;82(7):2357-62
7. Saccomanno K, Bassetti M, Lania A, Losa M, et al. A Immunodetection of glycoprotein hormone subunits in non-functioning and glycoprotein hormone- secreting pituitary adenomas. J Endocrinol Invest 1997; 20: 59-64.

8. Thapar K, Kovacs K, Laws ER. The classification and molecular biology of pituitary adenomas. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 1995; 22: 3-53.
9. Saeger W, Wilczak W, Ludecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R. . Hormone markers in pituitary adenomas: changes within last decade resulting from improved method. *Endocr Pathol.* 2003;14(1):49-54
10. Sano T, Yamada S, Ozawa Y, Shimatsu A. Endocrine surgical pathology: lesson from pituitary cases that are discordant between clinical and pathologic diagnoses. *Endocr Pathol.* 2003 ;14(2):151-7.
11. Chanson P. Gonadotroph pituitary adenomas. *Ann Endocrinol* 2000; 61: 528-68.
12. Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, Puzzilli F, Liberati F, Maira G. . Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *J Clin Pathol.* 1999;52(2):107-11
13. Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, Puzzilli F, Liberati F, Ruggeri A, et al. Adrenocorticotrophic hormone secreting pituitary adenomas: analysis of growth fraction using the MIB-1 antibody. *Tumori.* 2000 ;86(3):229-32
14. Pizarro CB, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP. Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(2):235-43
15. Schreiber S, Saeger W, Ludecke DK. Proliferation markers in different types of clinically non-secreting pituitary adenomas. *Pituitary.* 1999 ;1(3-4):213-20
16. Mastronardi L, Guiducci A, Fabrizio P. Lack of correlation between Ki-67 labelling index and tumour size of anterior pituitary adenomas. *BMC Cancer.* 2001; 1: 12.
17. Yonezawa K, Tamaki N, Kokunai T. Clinical features and growth fractions of pituitary adenomas. *Surg Neurol.* 1997;48(5):494-500
18. Hentschel SJ, McCutcheon E, Moore W, Durity FA. . P53 and MIB-1 immunohistochemistry as predictors of the clinical behavior of non-functioning pituitary adenomas. *Can J Neurol Sci.* 2003;30(3):215-9
19. Fukui S, Otani N, Nawashiro H, Yano L, Nomura N, Miyazawa T, et al. Subcellar localization of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor 1 in pituitary adenomas. *Brain Tumor Pathol.* 2002;19(1):23-9
20. Losa M, Franzin A, Mangili F, Terreni MR, Barzaghi R, Veglia F., et al. Proliferation index of non-functioning pituitary adenomas: correlations with clinical characteristics and long-term follow-up results. *Neurosurgery* 2000; 47(6): 1313-8.
21. Meindermann T, Wilson CB. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994;41(3):359-64
22. Golkowski F, Trofimiuk M, Buziak-Bereza M, Czepko R, Adamek D, Huszno B. Pituitary tumours: hormonal status and immunohistochemical evaluation. *Przegl Lek.* 2003;60(5):338-41
23. Schofl C, Schofl-Siegert B, Karstens JH, Bremer M, Lenarz T, Cuarezma JS, et al. Falsely low serum prolactin in two cases of invasive macroprolactinoma. *Pituitary.* 2002;5(4):261-5.
24. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97 (5 supp 1): S4-S13.