

9. Białka MCM w diagnostyce różnicowej guzów nadnerczy

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Guzy nadnerczy rozpoznawane są względnie często, stanowiąc 5 – 9 % wszystkich guzów w organizmie człowieka. Postęp w diagnostyce obrazowej, jaki dokonał się w ostatnich latach, przyczynił się do znacznego zwiększenia ich wykrywalności. Przypadkowo zdiagnozowane guzy nadnerczy (tzw. incidentaloma) występują u 2 – 4 % ogólnej populacji, zaś w grupie osób starszych (po 70 r. ż.) – nawet do 7 %.

Spośród pacjentów z guzami nadnerczy do leczenia operacyjnego kwalifikowani są ci, u których występują wskazania endokrynologiczne (nadczynność wydzielnicza guza), bądź wskazania onkologiczne (podejrzenie nowotworu złośliwego). W pooperacyjnych badaniach histopatologicznych większość usuwanych zmian okazuje się łagodna – najczęściej rozpoznawany jest gruczolak kory nadnercza. Rak kory nadnercza rozpoznawany jest bardzo rzadko, jednak cechuje się złym rokowaniem, co wynika m. in. z braku wczesnych objawów i – związanego z tym – rozpoznawaniu większości przypadków w wysokim stopniu zaawansowania klinicznego. Decydującym kryterium różnicującym zmiany łagodne i złośliwe pozostaje wciąż klasyczne badanie patomorfologiczne, wsparte wynikiem indeksu proliferacyjnego Ki-67. W związku z tym poszukiwane są obecnie nowe wiarygodne markery, mogące wspomóc wczesne ustalenie prawidłowego rozpoznania.

Białka z rodziny MCM (minichromosome maintenance proteins) biorą w komórce udział m. in. w procesie replikacji materiału genetycznego i utrzymaniu integralności genomu. Wykrywane są jedynie w komórkach dzielących się i wykazują wzmożoną ekspresję w wielu rodzajach guzów, co pozwala na traktowanie ich jako potencjalne markery proliferacji.

Ustalenie wskazań do inwazyjnego leczenia guza nadnercza stawia chirurga przed wyborem właściwego dostępu operacyjnego. Od właściwej decyzji zależy skuteczne przeprowadzenie doszczętnego zabiegu chirurgicznego, jak również uniknięcie powikłań okołoperacyjnych.

Obserwowany jest również problem niezgodności wstępnego rozpoznania charakteru guza nadnercza, ustalonego na podstawie przedoperacyjnych badań klinicznych, laboratoryjnych i obrazowych, z ostateczną diagnozą, stawianą w wyniku badania

histopatologicznego. Wg danych z piśmiennictwa, odsetek fałszywych rozpoznań sięga w wybranych przypadkach 33 %.

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech powiązanych tematycznie artykułów.

Głównym celem pierwszej publikacji jest ocena możliwości zastosowania wybranych białek z rodziny MCM (MCM-3, 5 i 7) oraz białka Ki-67 jako markerów proliferacyjnych w diagnostyce różnicowej w łagodnych i złośliwych guzach kory nadnerczy. Badanie prowadzono na materiale archiwalnym preparatów gruczolaków (81) i raków (3) kory nadnerczy, pochodzących od pacjentów operowanych w I Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej UM we Wrocławiu (UMW) w latach 2004 – 2014. Preparaty przeniesiono na mikromacierze tkankowe (TMA), które następnie wybarwiono metodą immunohistochemiczną (IHC) z użyciem przeciwciał przeciwko MCM-3, 5, 7 oraz Ki-67.

Celem drugiego artykułu jest przedstawienie powikłań okołoperacyjnych i identyfikacja ich czynników ryzyka. Analiza objęła 170 pacjentów (177 zabiegów) poddanych adrenalektomii w powyższej Klinice w latach 2004 – 2015. Płeć pacjenta, wskazania do zabiegu, operowana strona ciała, dostęp chirurgiczny oraz doświadczenie operatora (wyrażone jako łączna liczba wykonanych resekcji nadnerczy) wzięto pod uwagę jako możliwe czynniki ryzyka powikłań okołoperacyjnych.

Celem trzeciej pracy jest analiza zgodności wstępnego rozpoznania klinicznego z ostateczną diagnozą patomorfologiczną. Przeanalizowano dane 214 pacjentów (230 preparatów) operowanych w powyższej Klinice w latach 2004 – 2018. Przedstawiono w szczególności przypadki niezgodności rozpoznań i przedyskutowano ich potencjalne przyczyny.

W pracy nr 1 wykazano, że złośliwe guzy kory nadnerczy cechowały się większą średnicą ($p=0.017$) i objętością ($p=0.017$) oraz wyższymi wartościami indeksu proliferacyjnego białka Ki-67 ($p=0.005$), MCM-3 ($p=0.005$), MCM-7 ($p=0.008$), ale nie MCM-5 ($p=0.069$). Wartości indeksów były niezależne od wymiarów i czynności hormonalnej guza oraz wieku pacjenta. Krzywe ROC potwierdziły, że białka Ki-67 (AUC 0.984), MCM-3 (AUC 0.984), oraz MCM-7 (AUC 0.950), a nie MCM-5 (AUC 0.820) są wiarygodnymi markerami złośliwości guza.

W pracy nr 2 opisano 18 (10.2%) powikłań okołoperacyjnych, 12 (6.8%) chirurgicznych i 6 (3.4%) nie-chirurgicznych. Dostęp poprzez laparotomię ($p < 0.01$), zabiegi bardziej rozległe niż sama adrenalektomia ($p = 0.01$), bądź wykonywane przez mniej doświadczonych operatorów ($p < 0.01$) wiązały się z większym ryzykiem powikłań nie-chirurgicznych. Adrenalektomia prawo- i lewostronna wydają się być powiązane z ryzykiem odmiennych powikłań chirurgicznych, tj. krwawienia po stronie prawej, oraz uszkodzenia otaczających struktur nienaczyniowych po stronie lewej ($p = 0.05$).

W pracy nr 3 przedstawiono, iż większość rozpoznań zmian guzowatych nadnerczy cechowała się zarówno wysoką dodatnią wartością predykcyjną i czułością, za wyjątkiem guza chromochłonnego (odpowiednio: 60.0% i 67.7%) i torbieli nadnercza (odpowiednio: 100% i 37.5%). Chorzy z zespołem Cushinga byli częściej płci żeńskiej ($p = 0.009$), podczas gdy ci z przerzutami nowotworu do nadnerczy – płci męskiej ($p = 0.001$). Pacjenci z guzami nieczynnymi hormonalnie byli starsi niż ci z zespołem Cushinga czy Conna (odpowiednio: $p = 0.044$ i $p = 0.002$).

Białka Ki-67, MCM-3 i MCM-7, a nie MCM-5, są wiarygodnymi markerami diagnostycznymi w różnicowaniu łagodnych i złośliwych guzów kory nadnerczy. Na ich wartość nie mają wpływu wymiary, aktywność hormonalna guza, czy wiek pacjenta. Według wiedzy autorów jest to pierwsze tego typu opracowanie w światowej literaturze medycznej.

Nadnercza otoczone są przez liczne struktury anatomiczne (jak okrężnica, trzustka, śledziona, czy przepona), które mogą zostać uszkodzone podczas zabiegu adrenalektomii. Powikłania po procedurach laparoskopowych mogą być konsekwencją nieuważnego użycia koagulacji monopolarnej, czy ułożenia chorego na stole operacyjnym. Wysokie ciśnienie insuflacji podczas dostępu zaotrzewnowego minimalnie inwazyjnego może skutkować powstaniem rozedmy podskórnej.

Najniższą zgodność rozpoznania przed- i pooperacyjnego zabiegu zaobserwowano w guzach chromochłonnych i torbielach nadnerczy. Zespół Cushinga rozpoznawany jest częściej u kobiet, podczas gdy przerzuty nowotworowe do nadnerczy – u mężczyzn. Rak kory nadnercza może być początkowo diagnozowany jako guz nieczynny hormonalnie (stanowiąc 1,6 % przypadków w tej grupie), bądź jako nawrót uprzednio usuniętego guza, co zawsze powinno budzić podejrzenie nowotworu złośliwego.

10. MCM proteins in differential diagnosis of adrenal tumors

Summary of dissertation

Adrenal gland tumors (AGTs) are relatively common and constitute 5 – 9 % of all human tumors. Much better accessibility to diagnostic imaging procedures in recent years has revealed that the rate of AGTs is significantly higher than previously reported. The prevalence of incidentally detected adrenal mass (so-called incidentaloma) is about 2 – 4 % for general population and up to 7% in patients over 70 years old.

Among patients with adrenal tumors, two groups are qualified for a surgical treatment – those with endocrine indications (hormonal hypersecretion syndromes) or oncologic indications (suspicion of a malignant neoplasm). The majority of adrenal tumors are benign, with adrenocortical adenoma (ACA) being the most common diagnosis. Although adrenocortical carcinoma (ACC) are diagnosed quite rarely, they are associated with very poor prognosis, which is caused by the lack of early symptoms, that results in most of cases being diagnosed at an advanced clinical stage. To date, morphological features, combined with Ki-67 proliferative index, remain the standard for discriminating benign and malignant adrenocortical tumors. Therefore new reliable markers are searched for, that could be helpful in a diagnostic process.

The minichromosome maintenance (MCM) proteins are involved e. c. in a process of DNA replication and maintaining genome integrity. They can only be detected within dividing cells and are more prominently expressed in many types of tumors, which allows to treat them as possible proliferative markers.

Establishing an indication for an adrenalectomy implies the appropriate selection of operative access by the surgeon. The right decision warrants an effective and radical surgical resection, as well as a low rate of perioperative complications.

Additionally, there is an issue of discrepancy between an initial diagnosis of an adrenal tumor, based on preoperative clinical, laboratory and imaging studies, and the final diagnosis, based on histopathological evaluation. According to the available literature, the rate of false positive diagnoses may be as high as 33% in certain situations.

This dissertation consists of three articles, connected by a common theme.

The main aim of the first paper was to evaluate the role of minichromosome maintenance proteins MCM-3, MCM-5, MCM-7, and Ki-67 as proliferative markers in differential diagnosis of benign and malignant adrenocortical tumors. Archival specimens of 81 adrenocortical adenomas and 3 adrenocortical carcinomas of patients operated from 2004 to 2014 in 1st Department and Clinic of General, Gastroenterological and Endocrine Surgery, Wrocław Medical University, were retrieved. Then they were transferred on tissue microarrays (TMA), stained with antibodies against MCM-3, 5, 7 and Ki-67, using immunohistochemical (IHC) method.

The aim of the second paper was to present perioperative complications and risk factors of adrenal operations. In total 170 patients (177 procedures) who underwent adrenalectomy between 2004 and 2015 in the above mentioned Department were analyzed. Patient's sex, indication for the procedure, tumor laterality, surgical approach and surgeon's case volume were taken into consideration as possible risk factors for complications.

The aim of the third paper was to analyze the coherence between an initial clinical diagnosis with a final histopathological diagnosis. The analysis included 214 patients (230 specimens) clinical data of patients operated between 2004 and 2018 in above Department. Cases of inconsistent diagnoses were presented and possible reasons discussed.

In the first paper we proved that malignant tumors were characterized by a greater size ($p=0.017$), volume ($p=0.017$), and higher levels of Ki-67 ($p=0.005$), MCM-3 ($p=0.005$), MCM-7 ($p=0.008$), but not MCM-5 ($p=0.069$). The markers' levels were independent from the tumors' dimensions and hormonal function, as well as patient's. ROC curves showed Ki-67 (AUC 0.984), MCM-3 (AUC 0.984), and MCM-7 (AUC 0.950), but not MCM-5 (AUC 0.820) to be reliable markers.

In the second paper we described 18 (10.2%) perioperative complications, 12 (6.8%) surgical and 6 (3.4%) medical. Access through laparotomy ($p < 0.01$), operations more expansive than just adrenalectomy ($p = 0.01$) or performed by surgeons with smaller case volume ($p < 0.01$) were associated with increased risk of medical complications. Right and left adrenalectomy seem to be associated with a different kinds of risk and complications – a bleeding on the right side and an injury of surrounding structures on the left side ($p = 0.05$).

In the third paper we showed that the majority of diagnoses were characterized by both high positive predictive value and sensitivity, excluding pheochromocytoma (60.0% and 67.7%, respectively) and adrenal cyst (100% and 37.5%, respectively). Patients with Cushing's syndrome were more often females ($p = 0.009$), while those with metastases to adrenal gland – males ($p = 0.001$). Patients with non-functioning tumors were older than those with Cushing's or Conn's syndrome ($p = 0.044$ and $p = 0.002$, respectively).

Ki-67, MCM-3 and MCM-7 proteins, but not MCM-5, are reliable diagnostic markers in differentiation of benign and malignant adrenocortical tumors. These markers' levels are dependent neither from dimensions and hormonal activity of the tumor, nor the patient's age. To the best of authors' knowledge, this is the first such study presented in medical literature worldwide.

Adrenal glands are surrounded by various anatomic structures (such as colon, pancreas, spleen, diaphragm) that may be injured during adrenalectomy. Complications following a laparoscopic procedure may arise from the use of monopolar coagulation and the patient's position on the operating table. High insufflation pressure during retroperitoneoscopic procedures may cause subcutaneous emphysema.

The lowest diagnostic accuracy is observed in pheochromocytomas and adrenal cysts. Cushing's syndrome is more prevalent in females, while metastases to adrenal glands are more prevalent in males. Adrenocortical carcinoma may initially be diagnosed as a non-functioning tumor (1.6% of such cases) or a recurrence of a previously resected tumor, which should always raise a suspicion of a malignant neoplasm.