

Androgenreseptor og gonadotropinfrigjørende hormonreseptor i klinisk stumme gonadotrope hypofyseadenomer

Emilie Nygaard Jahnsen



Prosjektoppgave
Profesjonsstudiet i Medisin
Det Medisinske Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Januar 2022

Abstract

Background Nonfunctioning pituitary adenomas (NFPAs) are common neoplasms that often require surgical treatment and a multidisciplinary follow up. Markers that can predict an aggressive clinical course are lacking so far.

Objective The study aimed to determine the relative gene expressions of androgen receptor (AR) and gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) in gonadotroph NFPAs and compare these to clinical factors of aggressiveness as well as the gene expressions of estrogen receptor α (ER α) and follicle stimulating hormone β (FSH β).

Methods A total of 66 retrospectively collected tumor specimen were included in the study. Messenger ribonucleic acid (mRNA) was extracted and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to generate complementary deoxyribonucleic acid (cDNA). Relative gene expressions were determined by performing quantitative PCR (RT-qPCR).

Results There was no difference between females and males in the gene expression of AR (median 0.13, interquartile range (IQR) (0.07-0.20) and median 0.14, IQR (0.07-0.19), $P=0.77$, respectively) or the GnRHR (median 0.11, IQR (0.03-0.38) and median 0.10, IQR (0.04-0.29), $P=0.88$, respectively). The two receptors showed no correlation to each other (Spearman's correlation (r_s)=0.08, $P=0.51$). There was no association between the gene expressions and the clinical factors of aggressiveness. AR was negatively correlated to the ER α ($r_s=-0.33$, $P=0.008$). GnRHR was positively correlated to ER α and FSH β ($r_s=0.38$, $P=0.01$ and $r_s=0.77$, $P<0.001$, respectively), both exclusively in males.

Conclusions The results suggest that the relative gene expressions of AR and GnRHR is not associated with aggressiveness in gonadotroph NFPAs. However, the regulation of FSH-secretion through the GnRHR might be preserved in males. The results presented here needs validation in systematic prospective and in vitro studies.

Innholdsfortegnelse

ABSTRACT	1
INNHALDSFORTEGNELSE	2
FORORD	3
1. INNLEDNING	4
1.1 HYPOFYSENS ANATOMI OG HORMONER	4
1.2 DEN GONADOTROPE AKSEN	5
1.3 HYPOFYSEADENOMER	6
1.4 STUMME HYPOFYSEADENOMER	6
1.5 AGGRESSIVITET	7
1.6 ANDROGENRESEPTOR.....	8
1.7 GONADOTROPINFRIGJØRENDE HORMONRESEPTOR.....	9
2. FORSKNINGSPØRSMÅL	10
3. MATERIALE OG METODE	11
3.1 PASIENTER, VEVSINNSAMLING OG STUDIESELEKSJON.....	11
3.2 MARKØRER FOR AGGRESSIVITET	11
3.3 PRIMER DESIGN.....	12
3.4 FORBEREDELSE AV PRØVEMATERIALET	13
3.5 RT-QPCR.....	14
3.6 REFERANSEGENER	14
3.7 DATAANALYSE OG STATISTIKK.....	15
4. RESULTATER	16
4.1 RELATIV EKSPRESJON AV AR OG GNRHR	17
4.2 AR, GNRHR OG AGGRESSIVITET.....	17
4.3 KORRELASJON MED ANDRE GENER I DEN GONADOTROPE AKSEN	17
5. DISKUSJON	20
5.1 DISKUSJON AV HOVEDFUNN.....	20
5.2 BEGRENSNINGER OG FEILKILDER	23
6. KONKLUSJON	26
LITTERATURLISTE	27

Forord

Prosjektoppgaven er en obligatorisk oppgave på medisinstudiet ved Universitetet i Oslo. Mitt arbeid ble utført mellom januar 2021 og januar 2022.

Bakgrunnen for valget av oppgaven strekker seg tilbake til min barndom, hvor interessen for endokrinologi ble vekket i forbindelse med en MR-undersøkelse av hypofysen. Helt siden den gang har jeg vært fascinert av dette organets mange og viktige funksjoner. Derfor falt det naturlig for meg å skrive prosjektoppgave om nettopp hypofysen.

I mai 2020 tok jeg i kontakt med dr. Jens Bollerslev, som var ansvarlig for undervisningen i endokrinologi på mitt 3. studieår. Han koblet meg til min veileder Kristin Astrid Berland Øystese, som har vært en del av en forskningsgruppe ved Seksjon for Spesialisert Endokrinologi i samarbeid med Forskningsinstituttet for Indremedisin ved Rikshospitalet i Oslo. Hun fullførte sin doktorgrad på vekst og aggressivitet i stumme hypofyseadenomer i 2018. Jeg syntes temaet hørt spennende ut, og ønsket å skrive denne oppgaven som et lite bidrag til deres tidligere forskning.

Eksperimentene som inngår i oppgaven, er utført ved Forskningsinstituttet for Indremedisin på Rikshospitalet. Som følge av den pågående koronapandemien har laboratoriearbeidet vært en utfordring. På grunn av Regjeringens smitteverntiltak har jeg ved flere anledninger ikke hatt tilgang til sykehuset og har derfor trengt hjelp med å gjennomføre enkelte lab-forsøk. Jeg ønsker å understreke at ekstrahering av RNA ikke er utført av meg, men av bioingeniør Linn Olsen.

Jeg er svært takknemlig for alle som har bidratt med å realisere denne oppgaven. Først og fremst ønsker jeg å takke min veileder, Kristin, for god oppfølging og konstruktive tilbakemeldinger gjennom hele perioden. Det har vært spennende og meget lærerikt å jobbe med deg. Dernest retter jeg en takk til overingeniør Kjersti Normann Markussen for god hjelp og hyggelige stunder på laben. Jeg vil også takke bioingeniør Linn Olsen for å ha hjulpet meg RNA-ekstrahering i perioden jeg ikke hadde tilgang til sykehuset. Til slutt vil jeg takke min samboer, Thomas Skaug, for all støtte under arbeidet med prosjektoppgaven så vel som under studiet ellers.

Oslo, januar 2022

Emilie Nygaard Jahnsen

1. Innledning

Klinisk stumme hypofyseadenomer er benigne tumores som ikke fører til et klinisk syndrom som følge av hormonoverproduksjon (1). Svulstene er relativt vanlige og har en tendens til å residivere hos de rammede pasientene (1). Selv om ikke alle krever kirurgisk intervensjon, er oppfølging og behandling av slike adenomer ressurskrevende både for pasienter og helsevesenet (2). Til tross for at stumme hypofyseadenomer utgjør om lag halvparten av alle hypofysesvulster, har vi fremdeles i dag begrenset kunnskap om hva som driver deres vekst og aggressivitet (3). Det er et behov for å identifisere markører som kan ha prognostisk verdi og bedre oppfølgingen av denne pasientgruppen.

1.1 Hypofysens anatomi og hormoner

Hypofysen er et endokrint organ som regulerer mange funksjoner i kroppen (4). Kjertelen er lokalisert i sella turcica på basis av skallen og er forbundet med hypothalamus via hypofysestilken, også kalt infundibulum (4, 5). Synsnervekrysningen, chiasma, som inneholder nervefibre fra hvert øye, er lokalisert superior og anterior for kjertelen, og direkte anterior for infundibulum (4).

Anatomisk og fysiologisk deles hypofysen i to ulike deler (5). Den fremre hypofyselappen (adenohypofysen) er derivert fra epiteliale celler og deles videre inn i tre komponenter: pars distalis, pars intermedia og pars tuberalis (6). I pars distalis finnes i hovedsak fem ulike celletyper som danner acinære strukturer, der hver enkelt celletype er ansvarlig for produksjonen av et spesifikt hormon (5). Adrenokortikotropt hormon (ACTH), thyroidea stimulerende hormon (TSH), prolaktin (PL), veksthormon (GH) og gonadotropiner (follikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH)) dannes av henholdsvis kortikotrope, tyreotrope, laktotrope, somatotrope og gonadotrope celler (7). I tillegg er follikulostellate celler (FS) og parenkymale ikke-sekretende celler spredte komponenter i den fremre hypofyselappen (4, 5).

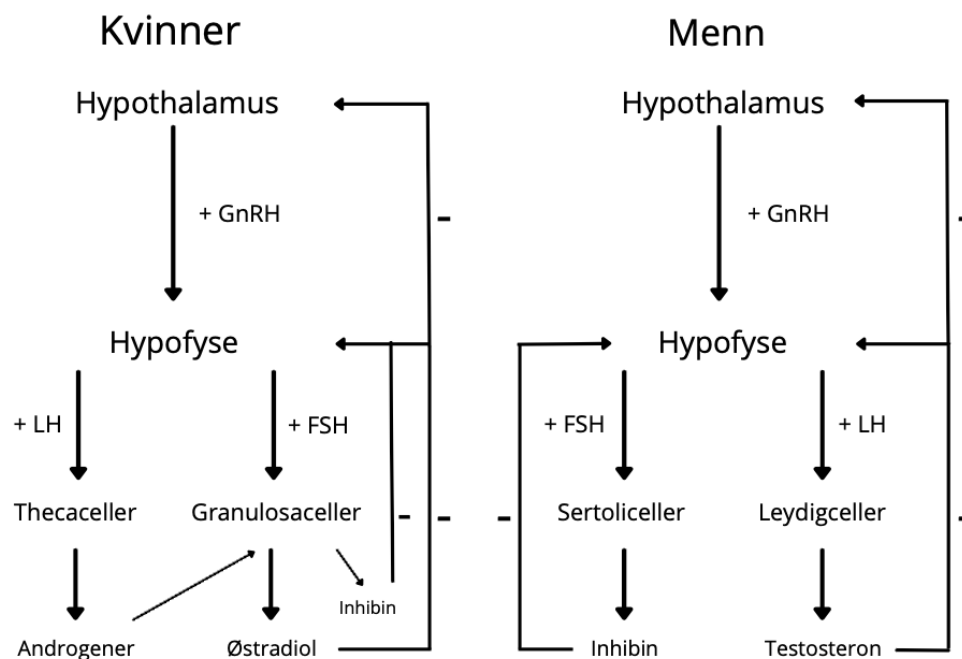
Den bakre hypofyselappen (nevrohypofysen) er derivert fra nevroektoderm og inneholder aksoner og nerveterminaler fra nevroner som har sine soma i hypothalamus (4, 5). Langsmed disse aksonene transporteres antidiuretisk hormon (ADH) og oksytocin fra hypothalamus til hypofysebaklappen, hvor de frigjøres fra nerveterminalene ved behov (4).

1.2 Den gonadotrope aksen

Hypothalamus er den overordnede regulatoren av hypofysens hormonutskillelse (8). Ved utskillelse av gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) fra hypothalamus, aktiveres gonadotropinfrigjørende hormonreseptor (GnRHR) i hypofysen og fører til sekresjon av gonadotropinene LH og FSH fra gonadotrope celler (8). Gonadotropiner er glykoproteiner som binder til reseptorer i gonadene og stimulerer til modning av kjønnsceller og produksjon av kjønnshormonene østradiol hos kvinner og testosteron hos menn (9-11). Dessuten fører stimulering med FSH til frigjøring av inhibin hos begge kjønn (12). En økning i konsentrasjon av perifere hormoner virker hemmende på hypothalamus og hypofysen via negativ tilbakekobling (biofeedback) (se figur 1) (13).

En av reseptorene som er ansvarlig for regulering av hypofysen er østrogenreseptor α ($ER\alpha$), som formidler virkningen av østradiol (14). Studier har funnet en sammenheng mellom tilstedeværelse av $ER\alpha$ og reintervensjonsrate (15, 16). Derfor ønsker vi med dette forsøket å undersøke om andre reseptorer som også bidrar til regulering av gonadotropinene påvirker aggressivitet og risikoen for residiv og derved reintervensjon.

Figur 1. Regulering av den gonadotrope aksen



Stimulerende effekt er markert med «+», inhiberende effekt er markert med «-».

Gonadotropinfrigjørende hormon, follikkelstimulerende hormon og luteiniserende hormon er forkortet henholdsvis GnRH, FSH og LH.

1.3 Hypofyseadenomer

Alle celler i hypofysen kan bli neoplastiske og gi opphav til tumorer (17). Ifølge epidemiologiske data forekommer hypofyseadenomer nokså hyppig og utgjør omtrent 10-20% av alle intrakranielle tumorer (18). I den generelle befolkningen har tumorene en prevalens på 1/100.000 og en insidens på 3,9-7,4/100.000 per år (18, 19). Mikroadenomer, det vil si små hypofyseadenomer som måler < 10 mm i diameter, er svært vanlige og oppdages sjelden fordi de ikke komprimerer nærliggende strukturer (1). Obduksjonsstudier har vist en forekomst på ca 3-23% av slike tumorer (20). Makroadenomer, det vil si tumorer som måler >10 mm i diameter, har større risiko for vekstprogresjon og å residivere sammenlignet med mikroadenomer (21).

Hypofyseadenomer deles funksjonelt og klinisk i to grupper (1). Den ene hovedgruppen karakteriseres ved kliniske trekk og biokjemiske hormonverdier knyttet til overflødig og ukontrollert hormonproduksjon, der det kliniske bildet avhenger av hvilken type hormonproduserende celle som er affisert (1). Den andre hovedgruppen av adenomer, såkalte ikke-funksjonelle eller stumme hypofyseadenomer, er neoplasmer som mangler et hormonelt hypersekretorisk syndrom (1). Enkelte studier har vist at klinisk stumme hypofyseadenomer kan produsere inaktive subenheter, men disse tumorene regnes likevel blant de stumme adenomene fordi det kliniske bildet er det samme (1).

1.4 Stumme hypofyseadenomer

Adenomer av den ikke-funksjonelle typen er blant de vanligste intrakranielle neoplasmene og utgjør omlag halvparten av hypofyseadenomene (3).

Klinisk presenterer stumme hypofyseadenomer seg med et bredt spekter av symptomer. Majoriteten av tumorene er asymptomatiske og oppdages som regel ikke (1). Dersom tumoren vokser henimot en viss størrelse, kan en rekke symptomer oppstå som følge av mekanisk kompresjon av nærliggende strukturer. De vanligste presentasjonene blant pasienter med kliniske symptomer er hodepine (56,5%) eller synsforstyrrelser (37,0%) (22). Dessuten kan tumorer som utgår fra hypofysen komprimere hypofysen selv, og følgelig forårsake hypopituitarisme eller hyperprolaktinemi (1). Dette medfører påvirkning av ulike hormonelle akser til tross for at tumor selv ikke produserer hormoner (3). I verste fall kan det mekaniske trykket påvirke sentrale blodkar, forårsake permanent synsnerveskade eller medføre

hypofysær apopleksi. Det sistnevnte kan resultere i et livslangt behov for erstatningsterapi (1, 23).

Gullstandarden for å diagnostisere et hypofyseadenom er bildediagnostisk undersøkelse ved hjelp av magnetisk resonans (MR) (1). I tillegg utføres en rekke kliniske undersøkelser, blant annet synsfeltundersøkelse, og biokjemisk testing for å vurdere om det foreligger hypofysesvikt (1, 3). De fem celletypene i adenoypofysen kan alle gi opphav til stumme hypofyseadenomer, men disse kan ikke skilles fra hverandre på bakgrunn av biokjemiske prøver, slik man diagnostiserer de hormonproduserende tumorene. For å kunne differensiere mellom de stumme hypofyseadenomene, må tumor undersøkes ved hjelp av immunhistokjemiske (IHC) analyser (24). Dette innebærer at man farger for hypofysehormoner og/eller spesifikke transkripsjonsfaktorer og undersøkelsen utføres etter operativ fjerning av tumor (24). Stumme hypofyseadenomer utgått fra gonadotrope celler har størst forekomst, og i en studie utført av Chanson et al. fant man at >80% av stumme hypofyseadenomer hadde gonadotrop differensiering (25).

Dagens behandlingsindikasjoner er ved synsforstyrrelser eller andre kliniske tegn på kompresjon av synsnervene, nevrologiske utfall eller hypofysær apopleksi (26). For øyeblikket finnes to tilgjengelige metoder for å behandle stumme hypofyseadenomer: Enten kan pasienten behandles med kirurgi, der tumorvev fjernes via transsfenoidal tilgang, eller med strålebehandling (1). I motsetning til de hormonproduserende tumorene, finnes det ikke medikamentelle behandlingsalternativer for stumme hypofyseadenomer (27). Til tross for gode prognoser og lav risiko for et malignt forløp, opplever mange pasienter sykdomsresidiv og trenger gjentatte kirurgiske behandlinger (27). Dette er ugunstig for pasienten av flere grunner, blant annet fordi kirurgi medfører risiko for infeksjon, blødninger og skade på strukturer som berøres i forbindelse med inngrepet (1). Ved transsfenoidal kirurgi er skade på synsnerver eller friskt hypofysevev viktige komplikasjoner, men forekomsten er lav (1).

1.5 Aggressivitet

Hypofyseadenomer er benigne tumorer som i svært sjeldne tilfeller viser malign utvikling (28). Til tross for dette kan tumorene vise aggressiv vekst. Et aggressivt hypofyseadenom er karakterisert ved evnen til rask volumforøkelse, invasjon av omkringliggende strukturer og resistens mot konvensjonell behandling (28, 29). Dette øker risikoen for tidlige og hyppige residiver. Aggressive hypofyseadenomer krever derfor oppfølging og behandling i

multidisiplinære team som involverer endokrinolog, nevrokirurg, patolog, radiolog og onkolog (28).

Dagens internasjonale retningslinjer anbefaler at pasienter med kirurgisk fjernede hypofyseadenomer følges opp med histopatologisk analyse som undersøker for proliferasjonsmarkøren Ki67 (28). Dersom Ki67 er forhøyet, følges pasientene også opp med p53 immundeteksjon og mitotisk telling (28). I tilfeller der tumor oppstår i tidlig alder, anbefales i tillegg genetisk testing (28). Det finnes fremdeles ingen klare prognostiske markører for stumme hypofyseadenomer som kan si noe om risikoen for aggressivitet. Det er imidlertid funnet en sammenheng mellom ER α og aggressivitet i prolaktinomer og stumme gonadotrope hypofyseadenomer og det er stilt spørsmål ved om en mindre differensiert celle kan vise større tegn til aggressivitet (15, 30).

1.6 Androgenreseptor

Androgenreseptor (AR) er en intracellulær transkripsjonsfaktor som aktiveres av androgene steroidhormoner (31). Reseptoruttrykket av AR er spesielt økt i hepatocytter, granuloceller, kjertelvev i mammae, peritubulære celler, Leydigceller og Sertoliceller, men reseptoren er også lokalisert i hypothalamus og hypofysen (31). AR er én av de fire transkripsjonsfaktorene som hører til Type 1 nukleære reseptorer (32). Denne gruppen er karakterisert ved at reseptoren er lokalisert i cytosol, bundet til Heat Shock Proteiner (HSP) (32). Når et steroidhormon binder til ligand-bindende domene (LBD) på AR, dissosierer HSP før reseptoren homodimeriserer og translokeres inn i nucleus (31). I cellekjernen binder AR-ligand-komplekset til androgen responderende elementer (ARE) og stimulerer til transkripsjon av ulike gener (31). I studier av brystkreft har man funnet at AR blant annet regulerer gener som er knyttet til cellevekst, proliferasjon, migrering, deoksyribonukleinsyre (DNA)-reparasjon og apoptose (32).

Stimulering av AR medfører aktivering av mange signalveier, der noen har vist seg å være relatert til kreft (32). Et eksempel på dette er aktivering av fosfoinositid 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signalveien (32). Videre har studier på prostatakreft vist at AR spiller en sentral rolle når det gjelder tumorvekst, og førstelinjebehandling har derfor vært knyttet til blokkering av reseptoren med androgen depriveringsterapi (ADT) (32). Dette står i kontrast til andre studier som har undersøkt AR sin betydning i hypofysesvulster.

Eksempelvis antydet Saeger et al. i 2001 at mangelen på uttrykk av AR kan være assosiert

med rask tumorvekst, da kun 1 av 60 tumorer i deres studie uttrykte AR ved IHC-undersøkelse (33). Dette støttes av Caronti sin studie fra 1995, som undersøkte AR sin inhiberende effekt på vekst i hypofysetumorer (34). Ifølge en artikkel fra Nature, har man i studier på brystkreft sett en sammenheng mellom genuttrykk av AR og ER i tumorceller, men den prognostiske rollen til AR i disse tumorene er fortsatt uklar (32).

1.7 Gonadotropinfrigjørende hormonreseptor

GnRHR tilhører gruppen av 7-transmembran G-proteinkoblede reseptorer (forkortet GPCR på engelsk) og aktiveres av hormonet GnRH som utskilles fra hypothalamus (35). Reseptoren uttrykkes primært i gonadotrope celler i hypofysen, men finnes også i noen nevroner og oligodendrocytter, hvor reseptoren har synaptisk funksjon (35). Ved binding av GnRH til LBD på GnRHR, assosierer reseptoren med G-proteiner og aktiverer et intracellulært signalsystem (35). Dette fører i sin tur til produksjon og utskillelse av gonadotropinene FSH og LH (35).

De senere tiårene har det vært reist flere hypoteser om hva som driver tumorgenese i gonadotrope adenomer. Mutasjoner i GPCRer har tidligere vært beskrevet som en viktig årsak til ulike sykdommer, deriblant adenomer i thyroidea (36). Kaye og Millar undersøkte derfor i sin studie i 1997 om mutasjoner eller polymorfismer - det vil si ulike utgaver av samme gen - kunne være årsak til tumorgenese i gonadotrope hypofyseceller (36). De fant imidlertid ingen aktiverende mutasjoner i GnRHR-genet ved undersøkelse av 18 gonadotrope adenomer (36). En annen studie, utført av Alexander og Klibanski i 1994, foreslår at defekter i syntesen av GnRHR kan ligge til grunn for manglende reseptorrespons fremfor at dette er relatert til cellulære signaleringsveier (37). De fant at GnRHR messenger ribonukleinsyre (mRNA) i tumorcellene korrelerte med respons på GnRH og at kun 1/3 av gonadotrope tumorer responderte på pulsatil stimulering med GnRH in vitro (37). I 1996 reiste Miller og de to forfatterne av den sistnevnte studien en hypotese om at gonadotrope celler innehar egenskapen til å bedrive parakrin eller autokrin regulering av cellefunksjon (38). Dette var fordi de i en ny studie påviste tilstedeværelse av både GnRH og GnRHR mRNA i normale og neoplastiske gonadotrope celler (38). Sanno et al. reiste den samme hypotesen i sin studie året etter (39). Til tross for forskningen som ble utført på 1990-tallet, vet vi i dag fortsatt lite om GnRHR sin betydning for stumme hypofyseadenomer.

2. Forskningsspørsmål

Formålet med prosjektoppgaven er å undersøke om genuttrykket av AR og GnRHR kan være assosiert med kliniske faktorer som tyder på aggressivitet i stumme gonadotrope hypofyseadenomer. Oppgaven er begrenset til å undersøke gonadotrope celler da disse utgjør størsteparten av stumme hypofyseadenomer og fordi andre varianter er lite representert i det tilgjengelige vevsmaterialet (25).

Konkret innebærer eksperimentet å:

- 1) Bestemme det relative mRNA-uttrykket av AR og GnRHR i klinisk stumme gonadotrope hypofyseadenomer og undersøke om disse korrelerer med hverandre.
- 2) Undersøke sammenhengen mellom genuttrykk av AR og GnRHR og de tre kliniske tegnene på aggressivitet:
 - Alder ved primæroperasjon
 - Tumorstørrelse
 - Reintervensjonsrate
- 3) Sammenligne det relative genuttrykket av AR og GnRHR med genuttrykket av ER α og follikkelstimulerende hormon β (FSH β), som ble undersøkt i de tidligere nevnte studiene (15, 17).

Vår hypotese er at lavt genuttrykk av reseptorene tyder på en mindre differensiert celle og et mer aggressivt klinisk forløp.

3. Materiale og metode

3.1 Pasienter, vevsinnsamling og studieseleksjon

De molekylærbiologiske undersøkelsene ble utført som en del av en retrospektiv studie på klinisk stumme hypofyseadenomer. Studien er samtykkebasert og godkjent av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) og forankret i Oslo Universitetssykehus. Resultatene som presenteres i denne oppgaven er sammenholdt med dataanalyser fra de tidligere nevnte studiene (15, 17).

Alle pasientene gjennomgikk kirurgisk behandling med fjerning av tumorvev over en periode fra 1996 til 2009 ved Oslo Universitetssykehus. Indikasjon for kirurgi ble stilt på klinisk grunnlag. Den kirurgiske reseksjonen ble i hovedsak gjennomført via transsfenoidal tilgang og kun noen få med transkraniel tilgang. Tumorvev ble innsamlet på operasjonssalen ved hver kirurgiske intervensjon og vevsprøvene ble avsatt i 2 ml rør. Disse ble fryst på is eller med flytende nitrogen, før lagring ved -80°C i fryseskap.

Totalt ga 195 pasienter samtykke til å delta i den opprinnelige studien. Tumorprøver fra primæroperasjon var tilgjengelig for 107 av pasientene, og 80 vevsprøver kunne brukes til eksperimentet etter at kvalitetskontroller med RNA-integritetsnummer (RIN)-skår var gjennomført (videre beskrevet nedenfor). Blant disse 80 prøvene ble 66 klassifisert som gonadotrope adenomer basert på IHC-undersøkelse fra den tidligere nevnte studien (15, 40). Oppfølgingen av pasientene ble avsluttet i september 2015.

3.2 Markører for aggressivitet

Aggressivitetsdefinisjonen tilsier at reseptorene må undersøkes opp mot volum, vekst, invasivitet og behandlingsresistens (28). I det tilgjengelige datamaterialet var følgende variabler tilgjengelige undersøkelser med hensyn på aggressivitet:

- Alder ved primæroperasjon: kan si noe om evne til rask vekst.
- Tumorumfangt: målt ved hjelp av Cavalieris metode på bakgrunn av MR-undersøkelse (27).
- Invasivitet: bestemt ved bruk av Knosp-gradering (27). Knosp er et etablert graderingssystem for invasjon ved hypofyseadenomer, som baserer seg på vekst utover ulike tangenter rundt arteria carotis på koronarsnitt (41). Graderingen går fra 0 til 4, der verdier > 2 betraktes som invasivt (41).

- Reintervensjonsrate: kan være et mål på vekstpotensialet til tumoren. Her er reintervensjonsrate definert som antall postoperative strålebehandlinger og/eller reoperasjoner, der behandling innen de første 12 måneder etter primæroperasjon er ekskludert.

3.3 Primer design

De offisielle National Center for Biotechnology Information (NCBI)-gensymbolene ble funnet på PubMed (42). Dette ble gjort ved å velge «gene» i menyfanen på nettsiden og deretter taste inn henholdsvis «androgen receptor» og «gonadotropin releasing hormone receptor». NCBI-symbolene ble funnet til å være «AR» og «GNRHR» for arten *homo sapiens*.

PrimerBank ble deretter brukt for å finne primere (43). I søket ble det spesifisert å søke etter «NCBI gene symbol» og «human» som art. Videre ble NCBI-symbolene (AR og GNRHR) tastet inn separat. Primerbanken fant tre mulige primer-par for AR og to for GnRHR.

En primer bør ideelt sett ha visse karakteristikk og egenskaper (44). For å avgjøre hvilken primer som var den best egnede, ble PubMed sin funksjon «PrimerBLAST» brukt til å teste spesifisitet (45). Det ble undersøkt om primerne hadde en lengde mellom 18-24 baser, smeltetemperatur (T_m) mellom 50-60°C, nukleotidfordeling med 40-60% G eller C innhold og selv-komplementaritet for 5'-ende og 3'-ende under en verdi på to (44). Alle faktorene ble undersøkt for samtlige primere og resultatene for de to best egnede primerkandidatene er vist i Tabell 1.

Til sist ble det undersøkt om produktene hver primer produserte, korresponderte med produktene som var ønsket. For å gjøre dette, ble genomet lastet ned fra Ensemble Data Base (www.ensembl.org) og undersøkt med hensyn på intron-ekson grenser ved å sammenligne primerne med deres lokalisasjon på genomet (46). Dette ble gjort ved å søke opp forover og revers primersekvens (reversert ved hjelp av «reverse complement» hos bioinformatics.org) og kontrollere at disse var lokalisert på ulike eksoner. Resultatene er vist i Tabell 1.

Tabell 1. Primersekvenser for AR og GnRHR

Gensymbol og ID ^a	Sekvens (5'→3')	Antall baser	Tm ^b	GC% ^c	Kompl ^d	3'Kompl ^e	Intron-ekson grense
AR 349501065c1	F ^f : CCAGGGACCATGTTTTGCC	19	59,03	57,89	5,00	1,00	Ulike eksoner
	R ^g : CGAAGACGACAAGATGGACAA	21	58,33	47,62	2,00	1,00	
GNRHR 61676182c1	F ^f : TGTCTGGAAAGATCCGAGTGA	21	58,47	47,62	4,00	1,00	Samme ekson
	R ^g : AGGTTGGCTAAGGTCAGATGTT	22	59,36	45,45	4,00	3,00	

^a NCBI gensymbol og PrimerBank ID

^b Temperatur i °C

^c G eller C nukleotider i %

^d Selv-komplementaritet (5'→3')

^e Selv-komplementaritet (3'→5')

^f Forover primer (5'→3')

^g Revers primer (5'→3')

3.4 Forberedelse av prøvematerialet

RNA ekstrahering

Vevsprøvene var blitt homogenisert på forhånd ved bruk av Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Et QIAGEN miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ble anvendt etter produsentens beskrivelser for å rense RNA. Et spektrofotometer, Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE), ble brukt for å måle absorbans og derved bestemme RNA-konsentrasjoner. RNA-kvalitet ble testet med elektroforesemaskinen Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) og kapillær gelelektroforesemaskinen QIAxcel Advanced system (Qiagen, Hilden, Germany). Kvaliteten på RNAet ble funnet til å være intakt for 80 av 107 prøver når man satte en avskjæringsverdi for RIN-skår til å være over fire (46).

Revers transkriptase polymerasekjedereaksjon (RT-PCR) og fortynninger

Revers transkriptase er et enzym som bruker RNA som oppskrift for å transkribere en komplementær DNA-tråd (cDNA) (47). Fra hver prøve ble 1µL RNA pipettert over i et High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) som deretter ble plassert i et Labnet MultiGene Gradient Thermal Cycler (Labnet International Inc,

Edison, NJ, USA). Derved ble cDNA dannet fra ekstrahert mRNA. Videre ble cDNAet fortynnet med H₂O til en ratio på 1:10 og brukt til kvantitativ PCR (qPCR) (46).

3.5 RT-qPCR

2 μL 1:10 fortynnet cDNA og 8 μL Mastermix (5,0 μL PerfeCTa SYBR Green FastMix, ROX (Quantabio, Beverly, Massachusetts, USA), 0,125 μL forover primer (Sigma-Aldrich), 0,125 μL revers primer (Sigma-Aldrich), 2,75 μL nukleasefritt vann (ncH₂O)), for en total av 10 μL per reaksjon ble avsatt i duplikat på en 384 brønnersplate ved hjelp av pipetteringsmaskinen epMotion 5070 (epMotion® 5070 CB, Hamburg, Tyskland). Deretter ble RT-qPCR gjennomført ved å bruke en ABI 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) maskin.

Amplifiseringen ble initiert ved oppvarming til 50°C i 2 minutter etterfulgt av en temperaturøkning til 95°C i 10 minutter. Deretter fulgte 40 sykluser ved 95°C i 15 sekunder og 60°C i 1 minutt. Smeltekurven ble generert ved et initialt denatureringssteg ved 95°C i 15 sekunder og 60°C i 15 sekunder etterfulgt av gradvis oppvarming til 95°C i 15 sekunder, som beskrevet av Normann et al. (46).

Parallellene til duplikatene ble undersøkt for avvikende verdier, men alle ble funnet til å ha akseptabel tilfeldig variasjon. I tillegg ble smeltekurven undersøkt for å lete etter produktspesifisitet og eventuelle primer-dimerer. Syklusterskelverdier (cycle treshhold, Ct) ble justert med det geometriske gjennomsnitt av de to referansegenene ALAS1 og GAPDH og genekspresjonen ble kvantifisert etter ΔCt-metoden på følgende måte (48):

$$\Delta Ct = 2^{-(Ct(\text{genet av interesse}) - Ct(\text{geometrisk gjennomsnitt av ALAS1 og GAPDH}))}$$

3.6 Referansegener

Referansegener er konstitutive gener, altså gener som alle celler må inneha og uttrykke for å opprettholde normal funksjon (49). Kvantifisering av mRNA-uttrykket til referansegener brukes derfor som endogene kontroller på prøve-til-prøve variasjoner når man utfører qPCR-undersøkelser.

I dette eksperimentet ble dataene justert ved å anvende to ulike referansegener: aminolevulinat syntase 1 (ALAS1) (PrimerBank ID: 362999012c3) og glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) (tilgangsnummer: 001256799). Disse genene er validert som stabile referansegener i stumme hypofyseadenomer i en studie utført av Normann et al (46).

For å bruke referansegener som kontroller, må en kalibreringskurve genereres ut ifra kvadratiske fortyninger (standardløsninger). Disse ble laget ved å avsette 85µL cDNA (bestående av cDNA høstet fra samtlige tumorprøver) og 255µL ncH_2O i én tube og fortygne dette ved å tilsette og blande 170µL ncH_2O i tre påfølgende steg. Dette resulterte i en fortynningsratio mellom cDNA og ncH_2O på 1:4, 1:8, 1:16 og 1:32. Den automatiske pipetteringsmaskinen epMotion® 5070 (CB, Hamburg, Tyskland) avsatte 2µL fra hver av de fire løsningene i hver sin brønn og tilsatte 8µL Mastermix (laget etter samme oppskrift som beskrevet ovenfor). Deretter ble standardløsningene analysert med RT-qPCR.

3.7 Dataanalyse og statistikk

Alle RT-qPCR-resultater ble sammenholdt med kliniske data og resultatene til andre gener som tidligere er undersøkt i samme kohort.

Statistiske analyser ble utført i statistikkprogrammet SPSS® (Version 26, 2019). Data har blitt analysert for kvinner, menn og kjønnene kombinert. Siden resultatene ikke betraktes som normalfordelte, ble Mann-Whitney U test brukt for å sammenligne kontinuerlige data mellom to grupper. Kji-kvadrattest ble brukt for å sammenligne to grupper med kategoriske variabler, mens den ikke-parametriske korrelasjonstesten Spearman rho (r_s) ble brukt til korrelasjonsanalyser. P-verdier < 0.05 ble vurdert til å være signifikante.

4. Resultater

Totalt 66 gonadotrope tumorer ble undersøkt med RT-qPCR. Preoperativt MR-bilde var tilgjengelig hos 25 av pasientene, hvorav 7 kvinner og 18 menn. Vi fant ikke forskjell i alder, tumorvolum, invasivitet, reintervensjonsrate eller genuttrykk av AR eller GnRHR mellom kvinner og menn (Tabell 2).

Tabell 2. Kjønnforskjeller i kliniske data og genuttrykk av AR og GnRHR

	Kvinner (n = 19)	Menn (n = 47)	Totalt (n = 66)	Sign.^a
Alder^b	54 (48-72)	57 (47-64)	57 (48-65)	0,83
Oppfølgingstid^c	114 (98-179)	142 (97-166)	137 (98-168)	0,76
Tumor volum^d	3665 (3561-6614)	6341 (4464-11192)	5918 (3825-10334)	0,12
Invasivitet^e	3 (43)	3 (17)	6 (24)	0,30
Strålebehandling^f	1 (5)	6 (13)	7 (11)	0,66
Reintervensjoner^g	4 (21)	17 (36)	21 (32)	0,23
AR^h	0,13 (0,05-0,30)	0,14 (0,07-0,19)	0,13 (0,07-0,20)	0,77
GnRHR^h	0,11 (0,03-0,38)	0,10 (0,04-0,29)	0,11 (0,04-0,31)	0,88
Totalt	19 (29)	47 (71)	66 (100)	

Median og interkvartilbredde (IKB) er gitt for alle kontinuerlige data. Antall (n) og prosent (%) av total er gitt for kategoriske variabler.

^a P-verdier er gitt for sammenligning av kjønnene

^b Alder i antall år ved primæroperasjon

^c Tid i antall måneder fra primæroperasjon til avslutning av oppfølging uavhengig av reintervensjoner

^d Preoperativt tumorvolum i mm³

^e Basert på Knosp-skår der verdier > 2 betraktes som invasivt

^f Inkluderer både adjuvant behandling innen 12 måneder og reintervensjoner

^g Reintervensjoner inkluderer postoperativ strålebehandling og sekundære operasjoner. Tidlig reintervensjon innen 12 måneder etter primæroperasjon regnes som adjuvant behandling og er derfor ikke regnet med. Én pasient fikk gjennomført både reoperasjon og strålebehandling, én pasient gjennomgikk totalt tre reoperasjoner og to pasienter gjennomgikk to reoperasjoner.

^h Δ CT-verdier

4.1 Relativ ekspresjon av AR og GnRHR

Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell mellom kvinner og menn i genuttrykk av AR eller GnRHR (Tabell 2). Det var tre av adenomene som hadde tydelig høyere genuttrykk av GnRHR sammenlignet med de andre. Dette gjaldt for to av kvinnene og én av mennene. Ekskludering av disse tre avvikene førte ikke til noen endring i signifikansverdi mellom kjønnene. Genuttrykket til AR og GnRHR korrelerte ikke med hverandre (Spearman korrelasjon (r_s)=0,08, $P=0,51$). Det var ingen statistisk signifikant sammenheng mellom alder og genuttrykket av de to reseptorene ($r_s=0,00$, $P=0,99$ og $r_s=-0,01$, $P=0,92$ for henholdsvis AR og GnRHR).

4.2 AR, GnRHR og aggressivitet

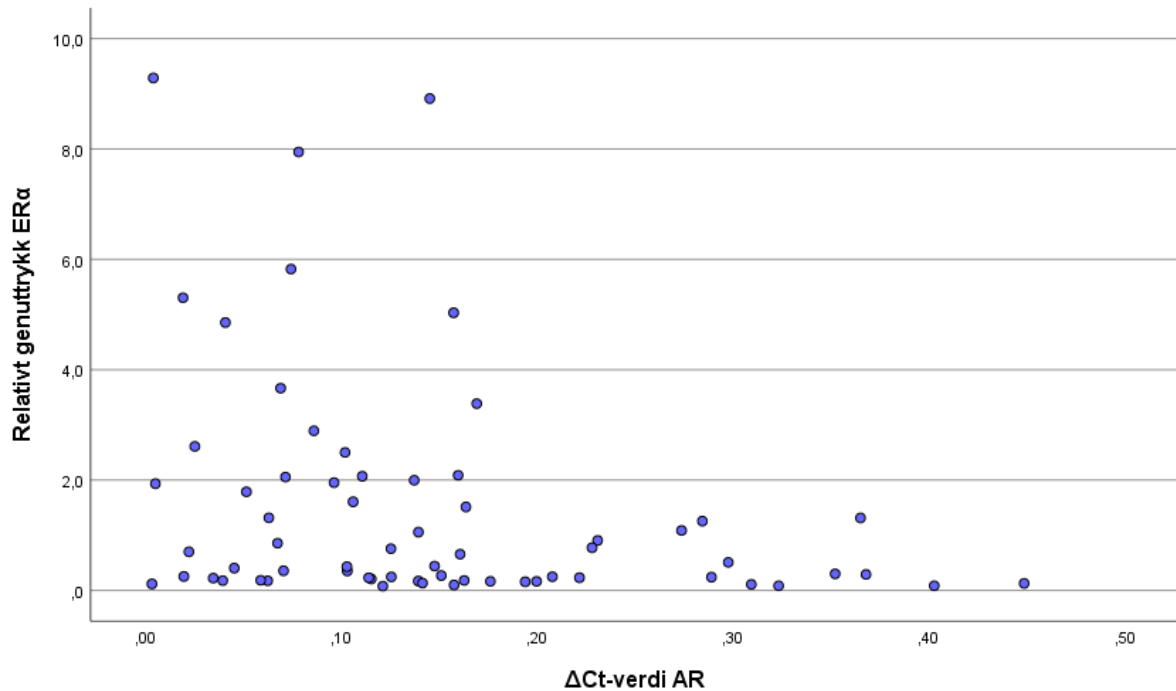
Genuttrykket til AR og GnRHR viste ingen sammenheng med tumorvolum ($r_s=0,1$, $P=0,31$ og $r_s=0,11$, $P=0,62$ for henholdsvis AR og GnRHR). Det ble ikke funnet noen assosiasjon mellom genuttrykket til AR eller GnRHR og reintervensjonsrate. Ekspresjonen av AR hadde medianverdi 0,13, interkvartilbredde (IKB) (0,07-0,23) og 0,14, IKB (0,07-0,20) for henholdsvis gruppen som fikk utført reintervensjon og gruppen som ikke fikk utført reintervensjon ($P=0,85$). Ekspresjonen av GnRHR hadde medianverdi 0,10, IKB (0,03-0,24) og 0,11, IKB (0,04-0,36) henholdsvis for gruppen som fikk utført reintervensjon og gruppen som ikke fikk utført reintervensjon ($P=0,29$).

4.3 Korrelasjon med andre gener i den gonadotrope akselen

Sammenligning med ER α

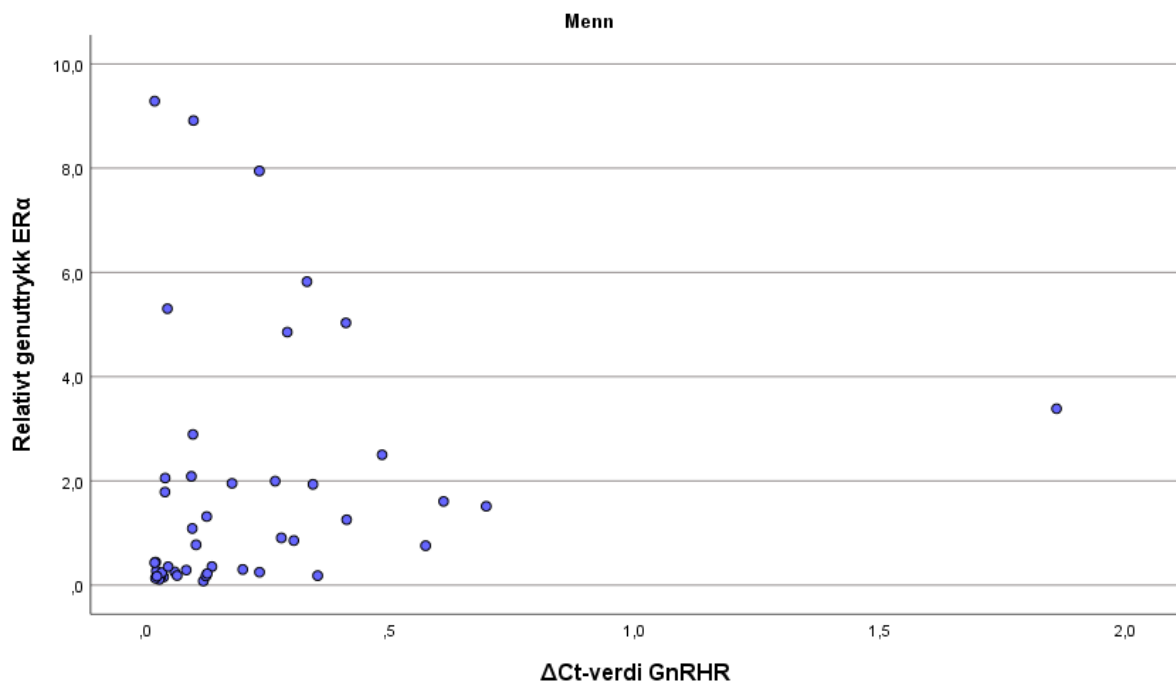
Genuttrykket av AR og GnRHR ble sammenlignet med genuttrykket av ER α ($n=65$). Korrelasjonsanalyser viste en signifikant, men svak sammenheng mellom AR og ER α ($r_s=-0,33$, $P=0,008$) og GnRHR og ER α ($r_s=0,25$, $P=0,05$). Det var tre av adenomene som hadde tydelig høyere genuttrykk av GnRHR sammenlignet med de andre. Korrelasjonen mellom GnRHR og ER α forble imidlertid signifikant når disse tre adenomene ble ekskludert fra analysene. Ved deling mellom kjønnene ble det funnet at ER α ikke korrelerte med GnRHR hos kvinner, men at sammenhengen var signifikant hos menn ($r_s=0,08$, $P=0,75$, $n=19$ og $r_s=0,38$, $P=0,01$, $n=46$ for henholdsvis kvinner og menn). For AR ble det ikke funnet noen forskjell i signifikans ved deling mellom kjønnene.

Figur 2. Korrelasjon mellom AR og ER α hos begge kjønn



Scatter-plot som viser sammenhengen mellom androgenreseptor (AR) (x-akse) og østrogenreseptor α (ER α) (y-akse) der begge kjønn er inkludert. Hver sirkel representerer én tumor sitt uttrykk av de to reseptorene. Vi ser en svak negativ sammenheng, der økt uttrykk av ER α ser ut til å korrelere med redusert ekspresjon av AR og motsatt ($r_s=-0,33$, $P=0,008$).

Figur 3. Korrelasjon mellom GnRHR og ER α hos menn

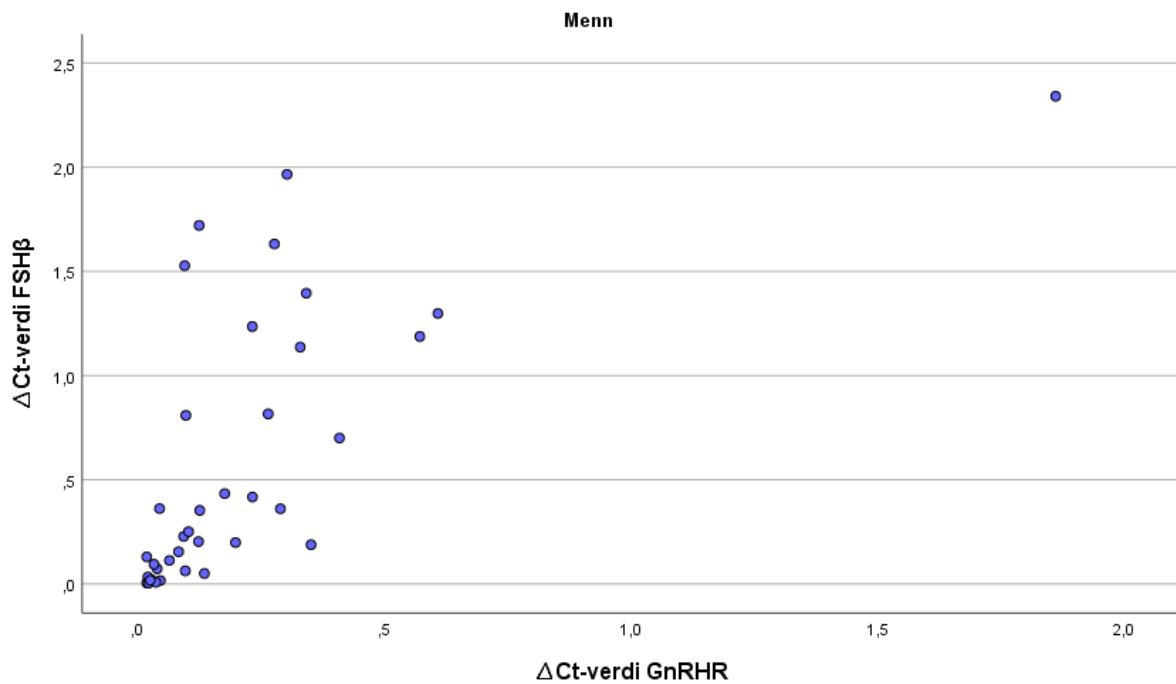


Scatter-plot som viser sammenhengen mellom gonadotropinfrigjørende hormonreseptor (GnRHR) (x-akse) og østrogenreseptor α (ER α) (y-akse) hos menn. Hver sirkel representerer én tumor sitt uttrykk av de to reseptorene. Vi ser en svak positiv sammenheng der økt uttrykk av én av reseptorene korrelerer med økt uttrykk av den andre reseptoren ($r_s=0,38$, $P=0,01$).

Sammenligning med FSH β

Genuttrykket til GnRHR ble sammenlignet med genuttrykket av FSH β (n=55). Det var ingen korrelasjon mellom genuttrykket av reseptorene hos kvinner, men det var en sterkt signifikant sammenheng hos menn ($r_s=0,38$, $P=0,14$, $n=17$ og $r_s=0,77$, $P<0,001$, $n=38$ for henholdsvis kvinner og menn).

Figur 4. Korrelasjon mellom GnRHR og FSH β hos menn



Scatter-plot som viser sammenhengen mellom gonadotropinfrigjørende hormonreseptor (GnRHR) (x-akse) og follikelstimulerende hormon β (FSH β) (y-akse) hos menn. Hver sirkel representerer én tumor sitt uttrykk av de to reseptorene. Vi ser en sterk positiv sammenheng der økt uttrykk av én av reseptorene korrelerer med økt uttrykk av den andre reseptoren ($r_s=0,77$, $P<0,001$).

5. Diskusjon

I denne studien ønsket vi å undersøke genuttrykket av AR og GnRHR i stumme gonadotrope hypofyseadenomer hos begge kjønnene og sammenligne dette med tre kliniske tegn på aggressivitet: 1) alder ved primæroperasjon, 2) tumorvolum og 3) reintervensjonsrate. Vi ønsket dessuten å sammenligne genuttrykket av de to reseptorene med hverandre og med ekspresjon av ER α og FSH β fra de tidligere nevnte studiene (15, 17).

Resultatene viste ingen forskjeller mellom kjønnene når det gjaldt genuttrykk av hverken AR eller GnRHR i stumme gonadotrope hypofyseadenomer. Reseptorene viste heller ingen korrelasjon til hverandre. Vi fant ingen sammenheng mellom nivået av genuttrykk til hverken AR eller GnRHR og alder ved primæroperasjon, tumorvolum eller reintervensjonsrate. Imidlertid fant vi at det var en negativ korrelasjon mellom genuttrykket av AR og ER α for begge kjønn, mens den positive korrelasjonen mellom GnRHR og ER α kun gjaldt for menn. Dessuten var det en positiv korrelasjon mellom GnRHR og FSH β , men denne sammenhengen gjaldt også kun for menn.

5.1 Diskusjon av hovedfunn

Genuttrykk av AR og GnRHR

Vi fant at genekspressjonen av AR ikke var signifikant forskjellig mellom kjønnene. Studier av både mennesker og dyr har vist at androgener hemmer ovariefunksjon og kan forårsake infertilitet ved å påvirke nevroendokrin funksjon hos kvinner (50). Mannlig infertilitet kan derimot være forårsaket av utilstrekkelig androgen stimulering eller mutasjoner i reseptoren, slik at androgenene ikke utøver sin virkning (51, 52). På grunn av denne viktige forskjellen i androgen regulering mellom kjønnene ville man kanskje forvente at genuttrykket av AR i hypofysen var ulikt mellom kvinner og menn, men våre funn strider altså med denne antagelsen. Årsaken kan være at vi har undersøkt tumorvev og ikke normalvev. Det er vanskelig å vite om funnene tilsvarer genuttrykk i normalt hypofysevev da vi ikke har slikt vev tilgjengelig for sammenligning.

Litteraturen sier lite om hvordan GnRHR er uttrykt hos kvinner og menn. Vi vet imidlertid at et velregulert GnRHR-uttrykk er avgjørende for å opprettholde maksimal reproduksjonskapasitet hos begge kjønn (53). Derfor vil det være rimelig å anta at GnRHR er

relativt likt uttrykt mellom kvinner og menn. Vår studie samsvarer med denne antagelsen da genuttrykket av GnRHR ikke var signifikant forskjellig mellom kjønnene.

I en musestudie utført av Genevieve et al. i 2017, fant man ved undersøkelser av mRNA at AR positivt regulerer GnRHR i gonadotrope hypofyseceller (54). En slik assosiasjon ble ikke påvist i vår studie av humant tumorvev. Det kan hende at utvalget i vår kohort ikke var stort nok til å vise en slik sammenheng. En annen mulighet er at AR ikke regulerer GnRHR i humane hypofyseceller slik som hos mus, eller at en slik regulering mangler i tumorvev sammenlignet med normalt hypofysevev.

Har AR og GnRHR betydning for aggressivitet?

Det finnes sparsomt med litteratur som beskriver genuttrykk av AR og GnRHR i stumme hypofyseadenomer. I studier av prostatakreft har man derimot funnet at AR er en viktig driver av tumorprogresjon (55). Av den grunn er AR-inhibering med antiandrogene medikamenter et sentralt behandlingsmål (55, 56). I studier av brystkreft har man også funnet en mulig sammenheng mellom AR og kreftutvikling (57, 58). Når det gjelder GnRHR, har en studie utført av Canzian et al. konkludert med at vanlige polymorfismer av GnRHR ikke er assosiert med risiko for brystkreftutvikling (59).

Våre resultater peker ikke i retning av sammenheng mellom genuttrykk av AR eller GnRHR og de tilgjengelige kliniske aggressivitetsmarkørene: alder ved primæroperasjon, tumorvolum og reintervensjonsrate. En mulig forklaring på hvorfor vi ikke fant noen assosiasjon kan være at vårt materiale ikke var stort nok for å påvise en slik sammenheng. Dessuten kan det hende at de tilgjengelige kliniske markørene for aggressivitet ikke er gode mål på dette, men at andre markører er bedre prediktorer. Eksperimentet har eksempelvis ikke sammenlignet genuttrykk med de andre aggressivitetsmarkørene som retningslinjene beskriver, for eksempel uttrykk av Ki67, P53 eller mitotisk telling (28). Alle svulstene inkludert i kohorten er operert på klinisk indikasjon, noe som medfører en seleksjon av tumorer med et visst vekstpotensiale. Dette kan bidra til mindre heterogenitet i adenomene som er undersøkt, og gjøre det vanskeligere å avdekke forskjeller mellom aggressive og mindre aggressive svulster.

Er det en sammenheng mellom AR og ER α ?

Det ble funnet en negativ korrelasjon mellom AR og ER α , men årsaken til denne sammenhengen er uklar. I studier av brystkreft har man funnet at forholdet mellom AR og

ER α spiller en viktig rolle ved resistens mot hormonell behandling, og at AR-ekspressjon er forbundet med bedre prognose (60, 61). Når det gjelder hypofyseadenomer viste studien til Øystese et al. at lavt uttrykk av ER α var assosiert med økt reintervensjonsrate (15). Det kan dermed hende at økt uttrykk av AR i stumme hypofyseadenomer, i motsetning til i brystkreft, er assosiert med en dårligere prognose og at dette henger sammen med uttrykket av ER α . Imidlertid var sammenhengen vi fant nokså svak, og må verifiseres i et større og mer systematisk innsamlet materiale.

Er det en sammenheng mellom GnRHR, ER α og FSH β ?

Det ble funnet en svak korrelasjon mellom GnRHR og ER α . Om resultatet kan forklares på bakgrunn av normalfysiologien i den gonadotrope akselen er uvisst. ER α er en reseptor som aktiveres av det perifere hormonet østrogen (62). Som tidligere nevnt medfører en økning i perifere hormoner negativ tilbakekobling på hypothalamus og hypofysen, slik at produksjonen og utskillelsen av hormoner fra disse organene reduseres (13). Studier på rotter har vist at østradiol også påvirker nivået av GnRHR (63). Det kan tenkes at GnRHR og ER α for eksempel reguleres av hverandre, men resultatet kan også skyldes differensiering av tumorvev fra normalt hypofysevev.

Våre resultater påviste en sterk assosiasjon mellom GnRHR og FSH β ($P < 0,001$). Siden adenomene er klinisk stumme, ville man kanskje forvente at FSH ikke ble produsert. Vårt funn støttes imidlertid av Hanson et al., som i sin studie demonstrerte at tumorcellene både produserte og skilte ut FSH in vitro og in vivo (64). Dette kan tyde på at reguleringen av FSH via GnRHR i klinisk stumme gonadotrope hypofyseadenomer er bevart. Det er likevel uklart om våre målinger samsvarer med normalfysiologi eller om funnet er forskjellig fra hva man ville påvist i normalt hypofysevev. I utgangspunktet var det ønskelig å sammenligne begge gonadotropinene (FSH og LH) med AR og GnRHR, men RT-qPCR-undersøkelser for LH var ikke tilgjengelige for vårt utvalg av tumorer.

Er assosiasjonen mellom GnRHR og FSH β kjønnsavhengig?

Det var en sterk korrelasjon mellom GnRHR og FSH β hos menn, men ingen signifikant korrelasjon hos kvinner. En mulig forklaring på hvorfor det var forskjell mellom kjønnene, kan være at få kvinner var representert i vår kohort. Dette kan gi manglende styrke til å påvise en sammenheng mellom GnRHR og FSH β . En annen forklaring kan være at menn er mindre

utsatt for sykliske hormonvariasjoner enn kvinner, og at dette kan påvirke reseptordistribusjonen (65). I tillegg var mange av kvinnene i vår kohort i klimakterisk alder, selv om de fleste var over den gjennomsnittlige alderen for menopause (66). Det kan tenkes at hypogonadisme som følge av menopause kan påvirke genekspressjonen og derved forårsake en slik kjønnsavhengig sammenheng mellom genuttrykkene. Vi manglet klinisk informasjon om menopause i vår kohort. I tillegg demonstrerte Ilie et al. i sin studie at subtyper av gonadotrope adenomer kan inneha ulike karakteristikk, og ulik fordeling mellom kvinner og menn (67). Vi har ikke tatt høyde for at det kan finnes ulike subtyper av gonadotrope adenomer, noe som kan påvirke resultatene. Alt i alt råder usikkerhet omkring den kjønnsavhengige sammenhengen mellom genuttrykkene av GnRHR og FSH β .

5.2 Begrensninger og feilkilder

I all forskning kan det oppstå ulike former av feil. Av størst betydning er såkalte *systematiske skjevheter* (bias), mens *tilfeldige feil* spiller en mindre viktig rolle fordi de som regel ikke påvirker resultatene i noen bestemt retning (68). Ved eksperimentelle studier er det viktig å identifisere og vurdere mulige feilkilder, slik at resultatene kan tolkes på rett måte.

Den mest åpenbare feilkilden ved dette eksperimentet er det retrospektive studiedesignet med manglende systematisk inklusjon av pasienter. Det tilgjengelige vevsmaterialet som ble brukt er hentet fra tidligere studier. Vi har ikke kjennskap til hvilke pasienter som også fikk utført kirurgisk reseksjon av hypofyseadenomer i samme tidsperiode, og som ikke er inkludert i vårt materiale. Følgelig er studien utsatt for seleksjonsbias, og resultatene som presenteres her kan derfor kun brukes hypotesegenererende (69).

En del av materialet var svært gammelt (enkelte vevsprøver var datert tilbake til 1996), med en vevskvalitet som var for dårlig til å utføre eksperimenter. Dette førte til et begrenset utvalg tumorprøver og derved tap av variasjon i faktorer som kjønn, alder og IHC-klassifisering. Ved analyse av ER α og FSH β , manglet data fra de tidligere studiene for henholdsvis 1 og 11 av pasientene som var inkludert i vår kohort. Dette kan ha påvirket eksperimentets generaliserbarhet.

Det ble en overvekt av menn sammenlignet med kvinner i vår kohort. Fordelingen mellom kjønnene var 29% kvinner og 71% menn. Det betyr at vårt utvalg var ytterligere skjevfordelt enn den opprinnelige kohorten (n=164), som besto av 38% kvinner og 62% menn (15).

Enkelte studier peker i retning av en større livsstilsprevalens for hypofyseadenomer for menn

enn for kvinner, mens andre sier det motsatte (70-72). Sammenlignet med epidemiologiske data var det likevel en større skjevfordeling i den opprinnelige kohorten enn man skulle forvente, uten at bakgrunnen for dette var kjent (15). I vårt materiale måtte flere av prøvene ekskluderes på grunn av dårlig vevskvalitet. Dette kan ha medført en ytterligere bias som kan ha forstyrret forholdet mellom antallet kvinner og menn. Til tross for skjevfordelingen mellom kjønnene var antall reintervensjoner omtrent likt fordelt mellom kvinner og menn. Dette stemmer overens med funnene i den store kohorten (15).

Medianalderen ved primæroperasjon hos pasientene i vår kohort (n=66) var tilnærmet lik den opprinnelige kohorten (n=195), men kvinnene som gruppe var yngre i vårt utvalg (54 år versus 61 år) (15). En mulig forklaring på hvorfor medianalderen til kvinnene var lavere i vår kohort, kan være at svulstene som var tilgjengelige for analyser i hovedsak tilhørte de yngste kvinnene.

Tumorvolum, beregnet ved hjelp av MR-undersøkelser, viste ingen signifikant forskjell mellom de to kjønnene. Mennene hadde imidlertid større median tumorvolum enn kvinnene (3665mm³ og 6340mm³ for henholdsvis kvinner og menn). Dette samsvarer med studiene utført av Ilie et al. og Somma et al., som fant at de største stumme hypofyseadenomene var signifikant assosiert med det mannlige kjønn (67, 73). Kohorten som ble undersøkt manglet MR-undersøkelser for en stor del av pasientene og har derved redusert styrke til å påvise forskjell mellom kjønnene. Det var imidlertid heller ingen signifikant forskjell i preoperativt tumorvolum mellom kvinner og menn når større deler av den opprinnelige kohorten ble undersøkt (27).

Vi har basert vår definisjon av aggressive hypofyseadenomer på internasjonale retningslinjer, som vektlegger radiologiske undersøkelser av tumorvolum, invasivitet og vekst, i tillegg til behandlingsresistens (28). Som følge av manglende preoperative MR-bilder, ble reintervensjonsrate - som med lang oppfølgingstid kan gi et inntrykk av vekstpotensialet i svulstene - vår viktigste markør for aggressivitet. Fordelen med å bruke reintervensjon som endepunkt, var at data var tilgjengelig for alle pasientene. I tillegg var oppfølgingstiden lang nok til at eventuell tumorvekst med stor sannsynlighet ville blitt oppdaget opp og behandlet. Samtidig kan eksempelvis forhold ved operasjonen, som kirurgens teknikk, tumorens lokalisasjon eller pasientens tilstand ved operasjonen, føre til at tumor ikke blir fjernet i sin helhet. Det er forsøkt å korrigere for slike forhold ved å ekskludere reintervensjoner som er utført innen de første 12 månedene etter primæroperasjon.

For å kvantifisere det relative genuttrykket ble mRNA ekstrahert og brukt som templat for å danne cDNA, før PCR-amplifisering. Metoden er ikke en direkte påvisning av reseptoren, og mRNAet i cellen viser kun et øyeblikksbilde av reseptorproduksjonen på et spesifikt tidspunkt i cellens livssyklus. Vi vet ikke om cellene har stabil reseptorproduksjon over tid eller om denne kan påvirkes av ukjente faktorer *in vivo* eller *ex vivo*. En kjent utfordring ved arbeid med RNA er at det raskt kan denaturere grunnet tilstedeværelse av ribonukleaser (RNAsen) i eukaryote celler (74). For å sikre at kvaliteten på det tilgjengelige vevsmaterialet var tilstrekkelig, ble samtlige prøver kontrollert ved hjelp av elektroforese og RIN-skåring.

For at et RT-qPCR-forsøk skal lykkes, må primerne være selektive og ikke amplifisere cDNA vi ikke ønsker å undersøke. Selv-komplementariteten for flere av primersekvensene til både AR og GnRHR hadde verdier > 2 , hvilket betyr at de *kan* amplifisere seg selv (Tabell 1). Uspesifikke primere som amplifiserer flere gener vil resultere i multiple og brede smeltekurver. Følgelig ble Ct-kurvene til samtlige prøver undersøkt for eventuelle primer-dimerer eller andre uforventede avvik, og alle ble funnet til å være representative.

I dette eksperimentet ble Ct-verdiene dessuten kontrollert mot to ulike referansegener. Metoden med å bruke Ct-verdier er ingen direkte påvisning av hverken reseptorer eller mRNA, men kan brukes som et uttrykk på relativ genekspressjon når man sammenligner med stabile referansegener. Hele metoden beror med andre ord på at disse referansegenene er stabile, at standardkurvene som lages er korrekte og at primerne for referansegenene amplifiserer det genmaterialet vi ønsker. På grunn av amplifiseringens natur, vil selv små feil kunne resultere i store avvik. Derfor ble alle prøvene kjørt i paralleller, hvorpå smeltekurvene til prøveparene ble undersøkt for divergens. Det ble ikke funnet noen avvikende smeltekurver blant våre prøver.

Til slutt er det verdt å nevne at alle forsøkene er utført av en medisinstudent med begrenset kunnskap om, og erfaring med, metodene som er brukt. Eksperimentene er utført under oppsyn av personell ved avdelingen. Alle statistiske analyser er utført i samarbeid med og under rettleidelse av veileder for prosjektoppgaven.

6. Konklusjon

Det ble ikke påvist noen forskjeller mellom kvinner og menn i det relative genuttrykket av hverken AR eller GnRHR og reseptorene viste ingen samvariasjon. Det ble heller ikke funnet noen sammenheng mellom AR eller GnRHR og de kliniske tegnene på aggressivitet. Vi fant en svak negativ assosiasjon mellom AR og ER α hos begge kjønn. GnRHR viste seg å være svakt assosiert med ER α og sterkt assosiert med FSH β , men disse sammenhengene gjaldt kun for menn.

Funnene tyder på at genuttrykket av AR og GnRHR ikke har sammenheng med aggressivitet i klinisk stumme gonadotrope hypofyseadenomer. Det kan imidlertid se ut til at reguleringen av FSH via GnRHR er bevart hos menn. Det finnes lite informasjon om hvorfor gonadotrope adenomer oppstår, og om de har intakt hormonproduksjon og utskillelse. Adenomene er ansett som stumme, men enkelte studier tyder på at de kan skille ut gonadotropiner. Ytterligere forskning kreves for bedre å forstå og behandle disse svulstene.

Materialet i denne studien er retrospektivt samlet inn og funnene bør derfor testes i cellestudier og valideres i prospektive studier som har systematisk inklusjon av pasienter.

Litteraturliste

1. Lund-Johansen M, Aanderud S, Schreiner T, Bollerslev J, Søren JB, Johannesen Ø, et al. Ikke-hormonproduserende hypofyseadenomer [Internett]. tidsskriftet.no: Tidsskriftet Den norske legeforening; 2003 [updated 28. aug; cited 2022 4. jan]. 2003:[Available from: <https://tidsskriftet.no/2003/08/oversiktsartikkel/ikke-hormonproduserende-hypofyseadenomer>].
2. Øystese KAB, Berg JP, Normann KR, Zucknick M, Casar-Borota O, Bollerslev J. The role of E and N-cadherin in the postoperative course of gonadotroph pituitary tumours. *Endocrine*. 2018;62(2):351-60.
3. Ntali G, Wass JA. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2018;21(2):111-8.
4. Jansen JKS, Glover J. Hypofysen [Internett]. Store medisinske leksikon: snl.no; 2020 [updated 3. juli 2020; cited 2022 5. januar]. Available from: <https://sml.snl.no/hypofysen>.
5. Larkin S, Ansorge O. Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2021, MDText.com, Inc.; 2000.
6. Dorton AM. The pituitary gland: embryology, physiology, and pathophysiology. *Neonatal Netw*. 2000;19(2):9-17.
7. Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;228(1-2):1-21.
8. Hasle J. Gonadotropiner [Internett]. sml.snl.no: Store medisinske leksikon; 2009 [updated 4. mai 2018; cited 2022 5. jan]. Available from: <https://sml.snl.no/gonadotropiner>.
9. Holesh JE, Bass AN, Lord M. Physiology, Ovulation. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
10. Jørgensen AP. Hypofysesykdommer. 1. utg. *Indremedisin I: Fagbokforlaget*; 2019.P 231-240
11. Berg JP. LH - luteiniserende hormon [Internett]. sml.snl.no: Store medisinske leksikon; 2009 [updated 8. mars 2021; cited 2022 5. jan]. Available from: <https://sml.snl.no/LH - luteiniserende hormon>.
12. Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Human Reproduction Update*. 2005;11(2):123-35.
13. McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L, McNeilly JR. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Suppl*. 2003;61:463-76.
14. Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG. Role of Estrogen Receptor- α in the Anterior Pituitary Gland. *Molecular Endocrinology*. 1997;11(6):674-81.

15. Øystese KA, Casar-Borota O, Normann KR, Zucknick M, Berg JP, Bollerslev J. Estrogen Receptor α , a Sex-Dependent Predictor of Aggressiveness in Nonfunctioning Pituitary Adenomas: SSTR and Sex Hormone Receptor Distribution in NFPA. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(9):3581-90.
16. Gao H, Xue Y, Cao L, Liu Q, Liu C, Shan X, et al. ESR1 and its antagonist fulvestrant in pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;443:32-41.
17. Sjöstedt E, Kolnes AJ, Olarescu NC, Mitsios N, Hikmet F, Sivertsson Å, et al. TGFBR3L- An Uncharacterised Pituitary Specific Membrane Protein Detected in the Gonadotroph Cells in Non-Neoplastic and Tumour Tissue. *Cancers (Basel)*. 2020;13(1).
18. Drummond JB R-OAJ, Soares BS. Non-Functioning Pituitary Adenomas. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al, editors *Endotext* [Internet]. 2020.
19. Daly AF, Beckers A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020;49(3):347-55.
20. Burrow GN, Wortzman G, Rewcastle NB, Holgate RC, Kovacs K. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. *N Engl J Med*. 1981;304(3):156-8.
21. Pernik MN, Montgomery EY, Isa S, Sundarajan C, Caruso JP, Traylor JI, et al. The natural history of non-functioning pituitary adenomas: A meta-analysis of conservatively managed tumors. *J Clin Neurosci*. 2022;95:134-41.
22. Freda PU, Bruce JN, Khandji AG, Jin Z, Hickman RA, Frey E, et al. Presenting Features in 269 Patients With Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas Enrolled in a Prospective Study. *J Endocr Soc*. 2020;4(4):bvaa021.
23. Hasle J. Hypofysær apopleksi [Internett]. sml.snl.no: Store medisinske leksikon; 2009 [updated 6. des 2018; cited 2022 4. jan]. Available from: https://sml.snl.no/hypofysær_apopleksi.
24. Osamura R, Grossman A, Korbonits M, Kovacs K, Lopes M, Matsuno A, et al. Tumors of the pituitary gland. 4. utg ed. WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
25. Chanson P, Brochier S. Non-functioning pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(11 Suppl International):93-9.
26. Freda PU, Beckers AM, Katznelson L, Molitch ME, Montori VM, Post KD, et al. Pituitary incidentaloma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):894-904.
27. Øystese KA, Zucknick M, Casar-Borota O, Ringstad G, Bollerslev J. Early postoperative growth in non-functioning pituitary adenomas; A tool to tailor safe follow-up. *Endocrine*. 2017;57(1):35-45.
28. Raverot G, Burman P, McCormack A, Heaney A, Petersenn S, Popovic V, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas. *European Journal of Endocrinology*. 2018;178(1):G1-G24.
29. Chatzellis E, Alexandraki KI, Androulakis II, Kaltsas G. Aggressive pituitary tumors. *Neuroendocrinology*. 2015;101(2):87-104.

30. Delgrange E, Vasiljevic A, Wierinckx A, François P, Jouanneau E, Raverot G, et al. Expression of estrogen receptor alpha is associated with prolactin pituitary tumor prognosis and supports the sex-related difference in tumor growth. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(6):791-801.
31. AR [Internet]. [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org): The human protein atlas; [cited 2022 3. jan]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169083-AR>.
32. Michmerhuizen AR, Spratt DE, Pierce LJ, Speers CW. AR are we there yet? Understanding androgen receptor signaling in breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2020;6(1):47.
33. Saeger W, Schreiber S, Lüdecke DK. Androgen receptor in pituitary adenomas of the gonadotroph cell complex. *Pathol Res Pract*. 2000;196(11):771-3.
34. Caronti B, Palladini G, Calderaro C, Bevilacqua MG, Petrangeli E, Esposito V, et al. Effects of gonadal steroids on the growth of human pituitary adenomas in vitro. *Tumour Biol*. 1995;16(6):353-64.
35. GNRHR [Internet]. [proteinatlas.org](https://www.proteinatlas.org): The human protein atlas; [cited 2022 3. jan]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109163-GNRHR>.
36. Kaye PV, Hapgood J, Millar RP. Absence of mutations in exon 3 of the GnRH receptor in human gonadotroph adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;47(5):549-54.
37. Alexander JM, Klibanski A. Gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA expression by human pituitary tumors in vitro. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2332-9.
38. Miller GM, Alexander JM, Klibanski A. Gonadotropin-releasing hormone messenger RNA expression in gonadotroph tumors and normal human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(1):80-3.
39. Sanno N, Jin L, Qian X, Osamura RY, Scheithauer BW, Kovacs K, et al. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acids expression in nontumorous and neoplastic pituitaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(6):1974-82.
40. 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.
41. 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.
42. [Internet]. [ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov): US National Library of Medicine; [cited 2021 11. jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>.
43. [Internet]. pga.mgh.harvard.edu: Harvard Medical School; 2006 [updated 1. oktober 2006; cited 2022 11. jan]. Available from: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>.
44. How to design a primer [Internet]. [addgene.org](https://www.addgene.org) [cited 2021 11. jan]. Available from: <https://www.addgene.org/protocols/primer-design/>.
45. Primer-BLAST [Internet]. [ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov): U.S National Library of Medicine; [cited 2021 11. jan]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

46. Normann KR, Øystese KAB, Berg JP, Lekva T, Berg-Johnsen J, Bollerslev J, et al. Selection and validation of reliable reference genes for RT-qPCR analysis in a large cohort of pituitary adenomas. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016;437:183-9.
47. Børresen-Dale A-L. Revers transkriptase [Internett]. sml.snl.no: Store Medisinske Leksikon; 2009 [updated 30. jan 2020; cited 2022 31.01]. Available from: https://sml.snl.no/revers_transkriptase.
48. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 2008;3(6):1101-8.
49. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*. 2013;29(10):569-74.
50. Wang Z, Feng M, Awe O, Ma Y, Shen M, Xue P, et al. Gonadotrope androgen receptor mediates pituitary responsiveness to hormones and androgen-induced subfertility. *JCI Insight*. 2019;5(17).
51. Yong EL, Loy CJ, Sim KS. Androgen receptor gene and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9(1):1-7.
52. Singh S, Ilyayeva S. Androgen Insensitivity Syndrome. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
53. Odle AK, MacNicol MC, Childs GV, MacNicol AM. Post-Transcriptional Regulation of Gnhr: A Checkpoint for Metabolic Control of Female Reproduction. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
54. Ryan GE, Bohaczuk SC, Cassin J, Witham EA, Shojaei S, Ho EV, et al. Androgen receptor positively regulates gonadotropin-releasing hormone receptor in pituitary gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;530:111286.
55. Lim SC, Jansson PJ, Assinder SJ, Maleki S, Richardson DR, Kovacevic Z. Unique targeting of androgen-dependent and -independent AR signaling in prostate cancer to overcome androgen resistance. *Faseb j*. 2020;34(9):11511-28.
56. Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;360(1-2):38-43.
57. Anestis A, Zoi I, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. Androgen Receptor in Breast Cancer-Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules*. 2020;25(2).
58. McNamara KM, Moore NL, Hickey TE, Sasano H, Tilley WD. Complexities of androgen receptor signalling in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2014;21(4):T161-T81.
59. Canzian F, Kaaks R, Cox DG, Henderson KD, Henderson BE, Berg C, et al. Genetic polymorphisms of the GNRH1 and GNRHR genes and risk of breast cancer in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). *BMC Cancer*. 2009;9:257.
60. Basile D, Cinausero M, Iacono D, Pelizzari G, Bonotto M, Vitale MG, et al. Androgen receptor in estrogen receptor positive breast cancer: Beyond expression. *Cancer Treat Rev*. 2017;61:15-22.
61. Hickey TE, Irvine CM, Dvinge H, Tarulli GA, Hanson AR, Ryan NK, et al. Expression of androgen receptor splice variants in clinical breast cancers. *Oncotarget*. 2015;6(42).

62. Kumar N, Gulati HK, Sharma A, Heer S, Jassal AK, Arora L, et al. Most recent strategies targeting estrogen receptor alpha for the treatment of breast cancer. *Mol Divers*. 2021;25(1):603-24.
63. Bauer-Dantoin AC, Weiss J, Jameson JL. Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology*. 1995;136(3):1014-9.
64. Hanson PL, Aylwin SJ, Monson JP, Burrin JM. FSH secretion predominates in vivo and in vitro in patients with non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(3):363-70.
65. Goel N, Workman JL, Lee TT, Innala L, Viau V. Sex differences in the HPA axis. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1121-55.
66. Gjelsvik B, Rosvold EO, Straand J, Dalen I, Hunskaar S. Symptom prevalence during menopause and factors associated with symptoms and menopausal age. Results from the Norwegian Hordaland Women's Cohort study. *Maturitas*. 2011;70(4):383-90.
67. Ilie MD, Vasiljevic A, Louvet C, Jouanneau E, Raverot G. Gonadotroph Tumors Show Subtype Differences That Might Have Implications for Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4).
68. Svartdal F. Feilkilder i forskning snl.no: Store norske leksikon; 2019 [updated 13. des 2019; cited 2022 11. jan]. Available from: [https://snl.no/feilkilder i forskning](https://snl.no/feilkilder_i_forskning).
69. Groenwold RH. [Three types of bias: distortion of research results and how that can be prevented]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2013;157(40):A6497.
70. Tjörnstrand A, Gunnarsson K, Evert M, Holmberg E, Ragnarsson O, Rosén T, et al. The incidence rate of pituitary adenomas in western Sweden for the period 2001-2011. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(4):519-26.
71. Iglesias P, Arcano K, Triviño V, García-Sancho P, Díez JJ, Villabona C, et al. Prevalence, Clinical Features, and Natural History of Incidental Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas. *Horm Metab Res*. 2017;49(9):654-9.
72. Agustsson TT, Baldvinsdottir T, Jonasson JG, Olafsdottir E, Steinhorsdottir V, Sigurdsson G, et al. The epidemiology of pituitary adenomas in Iceland, 1955-2012: a nationwide population-based study. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(5):655-64.
73. Di Somma C, Scarano E, de Alteriis G, Barrea L, Riccio E, Arianna R, et al. Is there any gender difference in epidemiology, clinical presentation and co-morbidities of non-functioning pituitary adenomas? A prospective survey of a National Referral Center and review of the literature. *J Endocrinol Invest*. 2021;44(5):957-68.
74. Williams MA. Stabilizing the code-methods to preserve RNA prove their worth. *Biomark Insights*. 2010;5:139-43.