

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



**Kvantitativní analýza D2 dopaminových receptorů u klinicky
afunkčních adenomů hypofýzy**

Filip Gabalec

Dizertační práce doktorandského studijního programu vnitřní nemoci

HRADEC KRÁLOVÉ

2012

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Vnitřní nemoci

**Kvantitativní analýza D2 dopaminových receptorů u klinicky afunkčních adenomů
hypofýzy**

**Quantitative analysis of D2 dopamine receptors in clinically non-functioning pituitary
adenomas**

MUDr. Filip Gabalec

Školitel: Prof. MUDr. Jan Čáp, CSc.

Školitel konzultant: Doc. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Hradec Králové, 21. března 2012

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze své práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 21. března 2012

MUDr. Filip Gabalec

Poděkování

Děkuji svým školitelům prof. MUDr. Janu Čápovi, CSc. z II. interní kliniky a doc. PharmDr. Martinu Beránkovi, PhD. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LFUK a FN Hradec Králové za odborné vedení, cenné připomínky a inspiraci při realizaci své práce.

Děkuji také kolegům neurochirurgům – doc. MUDr. Davidu Netukovi, PhD., mjr. MUDr. Václavu Masopustovi, doc. MUDr. Jiřímu Náhlavskému, CSc. a MUDr. Tomáši Česákovi, PhD., za obětavý přístup a peroperační sběr tkání adenomů.

Práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury Univerzity Karlovy 79008. Data pro somatostatinové receptory byla získána za podpory aktuálně běžícího grantu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví IGA NT 11344–4/2010 ve spolupráci s Mgr. Monikou Drastíkovou z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Klinicky a funkční adenomy – současný stav znalostí.....	9
2.1	Definice.....	9
2.2	Epidemiologie.....	9
2.3	Etiologie a patogeneze.....	10
2.4	Klinický obraz.....	12
2.5	Diagnostika.....	13
2.5.1	Zobrazovací metody.....	13
2.5.2	Vyloučení hormonální nadprodukce.....	16
2.5.3	Vyloučení hypopituitarismu.....	16
2.5.4	Oftalmologické vyšetření.....	18
2.6	Léčba.....	18
2.6.1	Chirurgická léčba.....	19
2.6.2	Radioterapie.....	22
2.6.3	Medikamentózní léčba.....	23
2.7	Těhotenství.....	30
2.8	Kvalita života (QoL).....	30
3	Dopaminové receptory.....	32
3.1	Receptory spřažené s G-proteinem a mechanismus jejich akce.....	32
3.2	Klasifikace dopaminových receptorů.....	33
3.3	Úloha dopaminových receptorů v hypofýze.....	34
4	Somatostatinové receptory (SSTR).....	37
5	Cíle dizertační práce.....	41
5.1	Pracovní hypotézy.....	41
6	Použité metody a soubor nemocných.....	42
6.1	Pacienti.....	42
6.2	Histologie a imunohistochemie.....	45
6.3	Kvantifikace mRNA.....	45
6.4	Statistická analýza.....	46
7	Výsledky.....	48

7.1	Imunohistochemická charakteristika.....	48
7.2	Expres mRNA dopaminového D2 receptoru	49
7.3	Vztah exprese D2R a patologické klasifikace KAA	53
7.4	Expres mRNA somatostatinových receptorů podtyp SSTR2, SSTR3 a SSTR5	54
7.4.1	Expres SSTR v jednotlivých typech KAA.....	54
7.5	Porovnání exprese D2R a SSTR 2, 3 a 5.....	61
8	Diskuze	63
8.1	Limity kvantitativní analýzy.....	65
8.2	Somatostatinové receptory	65
8.3	Koexpres somatostatinových a dopaminových receptorů.....	67
9	Doporučení pro praxi.....	70
10	Závěry	71
11	Literatura.....	72
12	Seznam příloh.....	86

Použité zkratky

ACTH – adrenokortikotropní hormon

AIP – Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CBTRUS – Central Brain Tumor Registry of the United States

cDNA – „complementary deoxyribonucleic acid“ – komplementární DNA

CNS – centrální nervový systém

D2R – D2 podtyp dopaminového receptoru

DA – dopaminergní agonisté

DR – dopaminový receptor

EGF – epidermal growth factor – epidermální růstový faktor

EGFR – epidermal growth factor receptor – receptor pro epidermální růstový faktor

FDG - fluorodeoxyglukosa

FGF – fibroblast growth faktor – faktor stimulující fibroblasty

FSH – folikulostimulační hormon

GDP – guanosindifosfát

GH – "growth hormone" – růstový hormon

GHRH – „growth hormone“ – somatoliberin

GPCR – "G-protein coupled receptor" – receptor spřažený s G-proteinem

GTP – guanosintrifosfát

CHO-K1 – „chinese hamster ovary cells“ – buněčná linie derivovaná z buněk ovarií čínského křečka

IGF-I – inzulínu podobný růstový faktor I

iMR – intraoperační magnetická rezonance

KAA – klinicky afunkční adenom

LH – luteinizační hormon

MAPK – mitogen-aktivovaná proteinkináza

MEN 1 – mnohočetná endokrinní neoplazie I. typu

MR – magnetická rezonance

PCR – polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PP – polypeptid

PRL – prolaktin

Pttg – Pituitary tumor transforming gene

QoL – "quality of life" – kvalita života

RT-PCR – reverzně transkriptázová nebo-li zpětná polymerasová řetězová reakce

qRT-PCR – kvantitativní reverzně transkriptázová polymerasová řetězová reakce
v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

mRNA – messenger – ribonukleová kyselina

PET-CT – Pozitronová emisní tomografie

SPECT – „Single photon emission computed tomograph“ – Jednofotonová emisní
výpočetní tomografie

SSA – somatostatinová analoga

SSTR – somatostatinový receptor

TGF- α – transforming growth factor alfa – růstový faktor alfa

TRH – tyreotropin "releasing" (uvolňující) hormon

TSH – tyreotropin

VIP – vasointestinální aktivní peptid

1 Úvod

Dizertační práce představuje příspěvek k lepšímu pochopení role dopaminových receptorů v medikamentózní léčbě klinicky afunkčních adenomů. Nemocní s klinicky afunkčními adenomy tvoří poměrně velkou část mezi hypofyzárními tumory. Etiologie a patogeneze tohoto onemocnění není stále zcela objasněna. Primární léčebnou metodou je jednoznačně transsfenoidální neurochirurgický výkon, ten má však své limity a nevede ve většině případů k úplnému odstranění tumoru. Otázkou tedy zůstává zajištění nemocného po operaci. Radioterapie? Sledování? Medikamentózní léčba? Každá z variant má své klady a zápory. I přes velmi přesvědčivé možnosti medikamentózního ovlivnění prolaktinomů a akromegalie nevidíme stejné výsledky u klinicky afunkčních adenomů. Medikamentózní léčba je cestou ovlivnění receptorů jejich analogy. Dopaminergní agonisté a chimérická analoga pro somatostatinový a dopaminový receptor – dopastatiny působí cestou dopaminových receptorů. Rozhodli jsme se proto stanovit dopaminové receptory kvantitativně.

V teoretické části je podán přehled současných poznatků o klinicky afunkčních adenomech, možných cestách patogeneze těchto tumorů, klasifikaci, epidemiologii, klinických symptomech, diagnostice a léčbě. Je zde také souhrn poznatků o dopaminových a somatostatinových receptorech, se zaměřením především na hypofýzu, jejich složení, postreceptorové signalizaci a možnostech zobrazení.

Experimentální část práce analyzuje velkou skupinu nemocných s klinicky afunkčními adenomy a expresi dopaminového receptoru v nich. Podrobně je popsána naše metodika včetně protokolů – pro ty, kteří by se chtěli do stejného úkolu pustit. Součástí výsledků jsou i data o somatostatinových receptorech (podtyp 2, 3 a 5), jejichž expresi jsme začali stanovovat. I přes limitovaný význam v současné klinické praxi se zdá, že právě data o přítomnosti a množství receptorů by mohla hrát klíčovou roli v procesu výběru adekvátního léčebného schématu a úspěšné medikamentózní léčbě.

2 Klinicky afunkční adenomy – současný stav znalostí

2.1 Definice

Hypofyzární adenomy jsou nemetastazující nádory z buněk adenohipofýzy. Adenomy, které se neprojeví symptomy z nadprodukce hormonů, tedy nezpůsobují některý z klinických syndromů jako je Cushingův syndrom, hyperprolaktinémie nebo akromegalie, nazýváme klinicky afunkčními adenomy (KAA). Některé z nich neprodukují žádný hormon - tzv. null cell adenomy a onkocyty. Většina z nich ale syntetizuje a skladuje hypofyzární hormony. Hormonální tvorbu lze prokázat u adenomů bez hypersekrečních příznaků imunohistochemicky a elektronopticky až v 90 % případů. Nalézt lze zejména luteinizační hormon (LH), folikulostimulační hormon (FSH) nebo jejich α podjednotku. Tyto adenomy řadíme mezi gonadotropinomy. Dohromady tyto 2 typy tvoří asi 85 % operovaných KAA.¹ Zbývajících 15 % KAA jsou tiché adenomy, které sice hormon tvoří, ale nesecernují ho, nebo je hormon rozložen uvnitř buňky.² Jiné hormony se tvoří jen v nepatrném množství, proto se klinicky neprojeví. Nejčastěji je exprimován adrenokortikotropní hormon ACTH¹ – tzv. tiché (silent) kortikotropní adenomy, méně často zachytíme produkci imunoreaktivního PRL, GH či TSH. Některé adenomy produkují hormony „neklasické“ (neurotensin, cholecystokinin, galanin, VIP, PP polypeptid, angiotensin, atd.). Na základě různé definice může být podíl KAA mezi nádory hypofýzy: 10 % pro nádory zcela bez sekrece („null-cell“ adenomy) nebo až 35 % pro adenomy bez příznaků hypersekrece.³

2.2 Epidemiologie

Prevalence hypofyzárních adenomů není přesně známa a dostupná data se liší. V oblasti Stoke-on-Trent ve Velké Británii je za léta 1988–1998 udávána přibližná prevalence 190 — 280 případů na 1 milión obyvatel. Z toho na KAA připadá 70–90 případů na 1 milión obyvatel.⁴ Nově je udávána prevalence klinicky diagnostikovaných adenomů v průřezové studii lokalizované do několika regionů v Belgii, a to 1 případ na 1064 obyvatel.⁵ Při systematickém průzkumu se pohybovala frekvence záchytu adenomů hypofýzy v pitevních souborech od 3,5 %⁶ až po 35 %.⁷ Dle metaanalýzy těchto dat je

frekvence výskytu adenomů hypofýzy 14,4 %.⁸ V poslední statistické zprávě Centrálního registru mozkových tumorů ve Spojených státech Amerických (Central Brain Tumor Registry of the United States – CBTRUS) za léta 2004–2007 tvoří hypofyzární tumory 13,1 % histologicky ověřených afekcí, a řadí se tak na 2. místo v pořadí četnosti mezi všemi primárními tumory CNS.⁹ Velké rozdíly jsou i v systematickém průzkumu radiologických studií, kdy frekvence zachytu incidentalomů (tedy náhodně zachycených expanzí hypofýzy, které ne vždy dokáže radiolog rozlišit) byla od 10 %¹⁰ do 38,5 %.¹¹ I zde provedl Ezzat metaanalýzu s frekvencí zachytu expanzí hypofýzy v radiologických studiích 22,5 %.⁸ Ve více než 99 % jde o mikroadenomy, jejichž zvýšený záchyt byl zaznamenán v posledních letech díky zavedení nových zobrazovacích metod – zejména magnetické rezonance. Vzhledem k jejich velikosti nepůsobí nositeli žádné obtíže a ten se nemusí o mikroadenomu ani dozvědět.¹² Pokud se adenomy projeví klinickým syndromem z hormonální nadprodukce některého z hormonů nebo i jejich kombinací, mohou být zachyceny dříve. Příznaky z hypersekrece chybí přibližně u třetiny adenomů – klinicky afunkčních adenomů. Většina z nich jsou v době diagnózy makroadenomy (96,5 %).¹³ Incidence hypofyzárních tumorů je udávána asi 25 případů na 1 milión obyvatel. Ve výše zmíněné oblasti Stoke-on-Trent ve Velké Británii byla incidence hypofyzárních tumorů 19–28 nových případů na milión obyvatel a rok, z toho KAA 7–9 nových případů na milión obyvatel a rok.⁴ Častější je výskyt hypofyzárních adenomů u žen než u mužů (7:1), u KAA a GH produkujících adenomů je však predominance u mužského pohlaví. Výskyt dle pohlaví se lišil také v závislosti na věku, kdy predominance mužského pohlaví byla zřejmá po 50. roce života, u mladších osob bylo o něco více žen.¹⁴ Afroameričané jsou postiženi častěji než kavkazský typ populace.⁹ Nejvyšší incidence hypofyzárních adenomů je pak mezi 30 a 60 lety.^{9, 14} Vzácně se objevují hypofyzární adenomy u osob mladších 20 let.¹⁴

2.3 Etiologie a patogeneze

Patogeneze KAA nebyla dosud zcela objasněna. Analýzou alelické inaktivace X chromozomu byl zjištěn jejich monoklonální původ.¹⁵ Není jasné, zda za úvodní mutací stojí aktivace protoonkogenu či inaktivace tumor supresorového genu. Žádný ze známých onkogenů se nevyskytuje u hypofyzárních nádorů častěji.^{16, 17} Za zmínku stojí mutace ve dvou kritických nukleotidových sekvencích charakteristických pro doménu α podjednotky G_s-proteinu (kodon 201, kde je arginin zaměněn za cystein, nebo kodon 227, kde je glutamin zaměněn za arginin). U těchto mutací je blokována hydrolýza GTP. G_s-protein

membránového receptoru je tak stále udržován v aktivním stavu. Tato mutace proteinu – nazývaná gsp, se vyskytuje ve 30–40 % GH produkujících adenomů hypofýzy a u malého (7 %) počtu KAA. Nebyla však nalezena žádná korelace s věkem, pohlavím, velikostí či hladinou GH nebo IGF-I.¹⁸⁻²¹ Přímý důkaz, že trvalá aktivace cAMP díky gsp mutaci hraje primární roli při vzniku tumoru, nebo že ovlivňuje růst či rekurenci, chybí.²² Mutace vyskytující se v genetických syndromech asociovaných s nádory hypofýzy (MEN 1, PKAR1A nebo AIP) se ve sporadických tumorech nevyskytují. Dalším často zmiňovaným genem vyskytujícím se nejen v endokrinních tumorech je „pituitary tumor transforming gene“ (Pttg), který indukuje změny usnadňující tumorigenezu.²³ Mimo jiné také indukuje větší expresi p21 jako ochranného faktoru, který vrací růst k normě. To by vysvětlovalo nízký záchyt karcinomů hypofýzy u lidí, neboť k malignímu zvratu nedojde díky ochraně p21. Při předpokladu, že karcinom vzniká z předchozího makroadenomu, který je ale v naprosté většině případů chirurgicky odstraněn, je záchyt karcinomů nízký.²⁴ Zdá se, že samotná mutace, jejíž iniciální moment neznáme, není sama schopna růst adenomu zajistit. Předmětem zájmu jsou tedy další faktory. Faktor p27 je inhibitor buněčného cyklu. Jeho exprese je snížena v hypofyzárních adenomech v porovnání s normální hypofýzou a p27 chybí u metastazujících pituitárních tumorů.²⁵ Menší množství p27 u pituitárních adenomů je vlivem fosforylace, která p27 degraduje. Ke snížení p27 může dojít sekundárně aktivací proteinkinázy Akt a její nitrobuněčné signální cesty, která je aktivována u pituitárních tumorů. Sníženy jsou i další inhibitory buněčného cyklu p16 a p21.

Vliv releasing hormonů je sporný, neboť u transgenních myší dojde při stimulaci hypotalamickými hormony k hyperplázii okolní tkáně, ta však u lidského jedince není přítomna.¹⁸ Ektopická nadprodukce somatoliberinu (např. bronchiální karcinoid, malobuněčný karcinom plic, neuroendokrinní tumory pankreatu) způsobí nadprodukcí růstového hormonu, akromegalii, somatotropní hyperplázii a vzácně i formaci somatotropního adenomu.²⁶ U kortikotropních adenomů pak byla prokázána lokální sekrece kortikoliberinu (CRH), který pozitivně koreloval s proliferativním indexem Ki-67. Současně míra exprese mRNA pro CRH byla vyšší u makroadenomů a lokálně invazivních tumorů.²⁷ Bylo prokázáno i několik abnormalit v signální dráze a zpětné vazbě, neexistují však důkazy pro primární roli těchto změn v onkogenezi sporadických pituitárních tumorů. Tyto změny jsou však spíše následky neznámého primárního impaktu.²⁸ Roli mohou hrát růstové faktory: transformující růstový faktor α (*transforming growth factor α* – TGF) a epidermální růstový faktor (*epidermal growth factor* – EGF), které mají společný receptor

(EGFR). Exprese tohoto receptoru koreluje s agresivitou tumoru.^{29, 30} Jako další se uplatňují fibroblastové růstové faktory (FGF). U KAA byla zjištěna vysoká exprese aktivinu a nízká exprese follistatinu jako ochranného faktoru, kdy oba pocházejí z rodiny TGF.³¹ Jako další kofaktory tumorigeneze jsou zkoumány alterace nitrobuněčné komunikace.¹⁷ V souhrnu lze říci, že patogeneze KAA zůstává stále neobjasněna. Lze se domnívat, že výsledný nádorový růst je souhrou poruch několika systémů.

2.4 Klinický obraz

Nádory hypofýzy dělíme podle jejich velikosti při vyšetření zobrazovacími metodami na mikroadenomy (do 10 mm) a makroadenomy (nad 1 cm). Mikroadenomy se nemusí projevit žádnými symptomy a nejčastěji se jedná o náhodný záchyt při vyšetření zobrazovacími metodami z jiných důvodů (cévní mozkové příhody a další neurologická onemocnění, nádory, traumata, záněty). Takové nádory nazýváme incidentalomy. Mezi incidentalomy však patří i jiné nádory či afekce hypofýzy, které nemají klinické projevy a jsou objeveny „náhodně“. Expanzivně chovající se nádory se naopak projevují brzy širokým spektrem příznaků, pro které nemocný vyhledá lékaře. Symptomatologie je závislá na lokalizaci adenomu. V tureckém sedle může infiltrace a tlak na okolní zdravou tkáň způsobit částečnou hypofyzární dysfunkci nebo panhypopituitarismus až u 50 % nemocných. Obligátní je tedy testování hypofyzární funkce. Při infiltraci okolní tkáně přichází výpadek hormonů většinou v pořadí gonadotropiny (až 77 %) – GH – TSH – ACTH.³² Viz. také kapitola 2.5.3 Vyloučení hypopituitarismu. Lze říci, že snížená funkce hypofýzy vzniká v důsledku:

- 1) Kompresi její stopky s omezením přísunu hypotalamických hormonů do hypofýzy.
- 2) Nedostatek dopaminu při kompresi stopky vyvolá u třetiny nemocných hyperprolaktinémii.
- 3) Kompresi normální hypofyzární tkáně anebo infiltrace hypotalamu tumorem samotným.

Časté jsou bolesti hlavy nespecifického rázu, horší po ránu. Expandující masa v jinak rigidním kostěném tureckém sedle způsobí bolesti hlavy u 1/4 pacientů s makroadenomem. Napínání diafragmatu je hlavním faktorem stejně jako stoupající intrasellární tlak.³³ Tlačí-li tumor na *chiasma opticum*, je přítomen výpadek zorného pole, hlavně temporální části.³² Pro zrakové obtíže vyhledá lékaře 60–70 % nemocných¹³, kteří udávají anamnesticky spíše zhoršení zraku. Je-li tlak dlouhodobý, dochází k atrofii zrakového nervu. Šíří-li se adenom laterálně a parasellárně, mohou se objevit příznaky z útlaku struktur probíhajících

v kavernózním sinu – nervy III, IV, 1. a 2. větev V. anebo VI. hlavového nervu. Apoplexie – krvácení do tumoru – může být u některých nemocných první klinický projev ústící v náhlé prudké bolesti hlavy, poruchu zraku a hypopituitarismus. Výjimečně může tumor při velké expanzi infiltrovat mozkovou tkáň a prezentovat se z toho vyplývajícím širokým množstvím příznaků – epiparoxysmy, změny chování či kognitivní deficit. Při porušení kosti a infiltraci sfenoidálně může vzniknout i *rhinorrhea*. Extrahypofyzární rozsev je však u nádorů hypofýzy vzácný, nejčastěji metastazují do mening nebo intracerebrálně.

U menšiny pacientů mohou být zjištěny příznaky z nadprodukce intaktních gonadotropinů,³⁴ především FSH. Cooper a kol. hodnotil v přehledu klinické příznaky u 24 pacientů s hypersekrecí FSH.³⁵ Ve všech případech šlo o premenopauzální ženy, průměrný věk 32 let, které měly příznaky z nadměrné stimulace ovarii – nepravidelná menstruace, bolesti břicha a zvětšená ovaria. V 19 případech šlo o makroadenom, FSH bylo zvýšeno u 14 a normální u 10 pacientek. Naopak LH bylo nízké u 21 žen a estradiol zvýšený u 22 žen. U mužů se sekrece FSH z tumoru může výjimečně manifestovat zvětšením testes.³⁶ Vysoké hladiny gonadotropinů jsou přítomny i v menopauze či u selhání testikulární funkce, což může ztížit interpretaci. FSH i LH bývají obojí zvýšené zejména u primárního hypogonadismu. Tumory produkující LH jsou velmi vzácné, u mužů se projeví zvýšenou hladinou testosteronu, mastnou kůží a akné.³⁷

2.5 Diagnostika

2.5.1 Zobrazovací metody

Zobrazovací vyšetření je nezbytné u nemocných se symptomy z expanze tumoru. Pituitární adenomy tvoří okolo 82–92 % z paraselárních a selárních lézí v závislosti na tom, zda šlo o radiologickou studii či studii s operovanými pacienty.^{38, 39} Zbytek selárních lézí tvoří benigní cystické léze, germinální tumory, gliomy, lymfomy, meningiomy, metastázy karcinomů (nejčastěji karcinom prsu, plic, prostaty, méně pak např. karcinom pankreatu, nebo ledviny), vaskulární léze, granulomatózní a zánětlivé léze, infekce a pituitární hyperplázie (Tab. 1). Nejčastější z afekcí mimo adenomy je Rathkeho cysta (19–23 %) a kraniofaryngeom (15 %).³⁸ Metastázy tvoří asi 5–25 % případů.^{38, 39} Preferovanou zobrazovací metodou je magnetická rezonance pro svou větší rozlišovací schopnost pro měkké tkáně. Obzvláště v případě podezření na funkční adenom je užitečná dynamická MRI se zaměřením na oblast hypofýzy, kdy jsou skeny zachyceny během několika málo sekund po aplikaci injekčního kontrastu s gadoliniem. Dynamické MRI má vyšší

senzitivitu než ostatní zobrazovací metody právě pro mikroadenomy.⁴⁰ Samotná hypofýza může být konkávního, konvexního nebo plochého tvaru. Neurohypofýza má lehce zvýšenou intenzitu signálu oproti adenohypofýze v T1 vážených obrazech. Intenzita tohoto signálu klesá s věkem a chybí u diabetes insipidus a většiny lézí v zadní části hypofýzy.³⁷ Vlastní hypofýza pak může být větší během dospívání, těhotenství a v šestinedělí. Při dlouhodobé primární hypotyreóze, hypergonadotropním hypogonadismu nebo adrenální insuficienci může dojít k hyperplázii tyreotropních, gonadotropních a vzácněji pak kortikotropních buněk. Stejně tak se zvětší somatotropní nebo kortikotropní buňky při sekreci GHRH nebo CRH z karcinoidů či hypotalamických gangliocytomů.³⁷

Tabulka 1 Afeke v oblasti sella turcica

Cysty	Rathkeho, arachnoidální, epidermoidní, dermoidní
Nádory	Adenom hypofýzy sekreční nebo afunkční Kraniofaryngom Meningeom Tumory z germinálních buněk Schwanom Chordom Gliom optiku, astrocytom Nádory vycházející z cév Primární lymfom, plazmocytom Metastázy solidních nebo hematologických malignit
Malformace a hamartomy	Ektopická hypofýza, ektopická slinná žláza, hamartom hypotalamu, Gangliocytom
Různé	Arteriální aneurysma Histiocytóza X Lymfocytární hypofyzitida Sarkoidóza, tuberkulom Absces a jiné infekce Granulom z velkých buněk
Genetické	Expanze při mutaci transkripčních faktorů (např. PROP-1)
převzato z Hána V. Náhodně zjištěné expanze v sellární oblasti. Vnitř Lék 2007; 53 (7&8):816-820	

Hypofyzární mikroadenomy jsou většinou lokalizovány intrasellárně a mají kulovitý či oválný tvar, někdy mohou být oploštěné nebo trojúhelníkovitého tvaru. Oproti zdravé hypofýze jsou v T1 váženém obraze hypointenzní. Typicky v koronárních řezech mají signál podobný šedé hmotě mozkové a zdravá hypofýza se blíží silou signálu bílé hmotě. Nicméně oba signály si mohou být velmi blízké v intenzitě, proto je potřeba i ostatních obrazů. V T2 váženém obraze se již hypofyzární mikroadenomy více liší. Například 80 % mikroprolaktinomů bude hyperintenzních v T2 váženém obraze. Dvě třetiny adenomů s nadprodukcí GH mají isointenzní nebo hypointenzní obraz v T2.⁴¹ V dalším kroku je možno užít kontrastu s gadoliniem, kdy adenom oproti zdravé hypofýze vychytává méně. U makroadenomů, které se již projevují příznaky, MR děláme především k posouzení rozsahu, zhodnocení operability a diferenciální diagnostiky. Signál na T1 je o něco větší než u mikroadenomů, v T2 váženém obraze je patrná výrazná heterogenita signálů s ohledem i na cystické porce či nekrózy v adenomu.⁴²

2.5.1.1 Pozitronová emisní tomografie (PET-CT)

Použití PET-CT s 18F-fluorodeoxyglukosou (FDG) se v posledních letech rozšířilo zejména jako zobrazovací metoda pro staging a diagnostiku nádorových onemocnění. Víme, že hypofýza normálně neakumuluje FDG. Bergström a kol. ve své práci udává, že PET-CT, ale s 11C-methioninem, je užitečným nástrojem pro diagnostiku a hodnocení léčebné odpovědi pacientů s hypofyzárními tumory.⁴³ Další autoři ukazují, že funkční makro a mikroadenomy mohou vykazovat vyšší akumulaci FDG.^{44, 45} Použití PET-CT však v současné době nepatří mezi základní vyšetření a pro klinika je zajímavá spíše odpověď na otázku co s náhodným záchytem akumulace FDG v hypofýze při provedení PET-CT z jiné indikace. Dle retrospektivní analýzy velkého souboru Jeonga a kol. byl náhodně zachycený, fokálně zvýšený záchyt FDG lokalizovaný v hypofýze nalezen u 30 z 40 967 pacientů (incidence 0,073 %). Zhodnocení hormonálních funkcí bylo provedeno u 11 z nich a u 2 byla prokázána hormonální nadprodukce. V prvním případě GH a PRL, ve druhém GH. Histologické ověření bylo u 3 pacientů – u dvou byl potvrzen GH produkující adenom, u jednoho KAA. U 19 pacientů z 30 bylo provedeno MRI. Patologický nález byl u 18 pacientů, z toho byl jasný nález adenomu u 11 nemocných. U makroadenomu byla větší akumulace FDG než u mikroadenomu. Ani v jednom případě nebyly nalezeny známky svědčící pro metastázu primárního onemocnění, pro které bylo PET-CT prováděno.⁴⁶ Záchyt FDG v hypofýze je tedy vzácným nálezem, který však vyžaduje hormonální vyšetření a MRI hypofýzy v rámci další diagnostiky. Další možností

je použití PET se značenou aminokyselinou tyrosinem. Bergh a kol. hodnotil nálezy *in vivo* u 9 nemocných s KAA. Zjistil zvýšený záchyt akumulace tyrosinu u všech nemocných, po operaci docházelo ke snížení záchytu paralelně s redukcí objemu tumoru. Avšak u nemocných po radioterapii docházelo rovněž ke snížení akumulace tyrosinu i přes stejný objemem. Zřejmě v souvislosti s klesající biologickou aktivitou tumoru.⁴⁷

2.5.2 Vyloučení hormonální nadprodukce

Diagnóza KAA při nálezu hypofyzární masy, ať už náhodně či při útlakových příznacích, je stanovena vyloučením hormonální nadprodukce. Pátráme proto v anamnéze a při fyzikálním vyšetření po těchto příznacích. Vyšetření hormonů je rozhodující. K vyloučení akromegalie odebereme IGF-I, které interpretujeme s ohledem na věk a pohlaví. V případě pozitivního nebo nejasného výsledku použijeme k potvrzení nebo vyloučení akromegalie orální glukózový toleranční test, při kterém očekáváme supresi GH. K vyloučení Cushingovy choroby provedeme 1 mg noční dexametazonový supresní test. Alternativou je pak 24 hodinový sběr moči na volný kortizol. Při útlaku stopky hypofýzy může být přítomna mírná hyperprolaktinémie, která bývá příčinou diferenciálně diagnostických rozpaků. Hodnoty nad 250 $\mu\text{g/l}$ jsou již charakteristické pro prolaktinom.⁴⁸ Odběr prolaktinu je důležitý zejména pro odlišnou léčbu prolaktinomu oproti KAA. Stanovujeme také gonadotropiny, máme-li možnost, i jejich volné podjednotky. U 40 % pacientů je pozitivní odpověď β -LH, β -FSH a α -podjednotky na podání TRH v dynamickém testu, které můžeme využít k určení adenomu u hypogonadálního pacienta.⁴⁹ Specificita zvýšení podjednotek gonadotropinů u tohoto testu není jednoznačná, může dojít ke zvýšení i ostatních typů pituitárních tumorů.⁵⁰ Vzácně může dojít při TRH testu k apoplexii. Mechanismus není zcela jasný.⁵¹ Odebíráme také TSH a volné tyreoidální hormony.

2.5.3 Vyloučení hypopituitarismu

Hypopituitarismus může být způsoben útlakem hypofýzy, přerušením hypofyzární stopky nebo zasažením hypotalamu. Při progresivním růstu adenomu dochází k postupné ztrátě hormonální sekrece. Většinou v pořadí GH a/nebo gonadotropiny -> TSH -> ACTH jak bylo zmíněno výše. Jelikož k vzniku hypopituitarismu může docházet plíživě, klinické příznaky nemusí být pro pacienta ani lékaře nápadné. Prvními příznaky u ženy ve fertilním věku jsou poruchy menstruačního cyklu. Normální menstruační cyklus činí hypopituitarismus nepravděpodobným. U mužů jsou příznaky méně nápadné porucha

libida a potence, snížený růst vousů a ochlupení. Laboratorně k posouzení gonadotropní osy postačí bazální koncentrace LH, FSH a příslušného sexagenu (testosteron u mužů, estradiol u žen). Při hypopituitarismu jsou nízké hladiny pohlavních hormonů a nízké nebo normální gonadotropiny. Rovněž insuficience růstového hormonu je méně nápadná. Projevuje se zvýšením podkožního tuku hlavně na břiše, snížení svalové hmoty přispívá k pocitu slabosti a únavy. K posouzení sekrece růstového hormonu můžeme použít test s inzulínem navozenou hypoglykemií, která hodnotí současně i osu kortikotropní. Dále se používá test argininový a test se somatoliberinem (GHRH), ev. další testy. Sekundární hypotyreóza se projevuje kožními příznaky (suchá kůže, prosáklé podkoží či jazyk, suché vlasy), únavností, slabostí, změnou hlasu, zácpou, bývá adynamie, zimomřivost, bradykardií, perikaridálními výpotky, jsou nespecifické změny na ekg). K posouzení tyreotropní osy stačí vyšetření TSH a volných hormonů štítné žlázy (fT₄, fT₃). Očekáváme snížení volných hormonů při nízkém nebo normálním TSH. Nedostatek ACTH nevede k poruše sekrece mineralokortikoidů, ale deficit glukokortikoidů se může projevit hyponatrémii (pro poruchy vylučování vody v ledvinách a pro neadekvátní sekreci ADH) a hypoglykemií. Zvýšená je slabost, dále se objevuje únavnost, apatie, psychická alterace, nechutenství, nauzea a bolesti břicha. Dlouhotrvající deficit nadledvinových androgenů se projeví ztrátou axilárního a posléze pubického ochlupení u žen. Na výše zmíněné hyponatrémii se podílí i sekundární hypotyreóza, která je také příčinou zvýšené koncentrace cholesterolu, vyšší aktivity kreatinkinázy a transamináz v laboratorním nálezu. Diferenciálně diagnosticky je třeba odlišit primární adrenální insuficienci, Schmidtův syndrom a septický šok s relativní insuficiencí nadledvin. Mimo bazální stanovení kortizolu v séru a ACTH používáme k orientačnímu zhodnocení adrenokortikální rezervy Synacthenový test s analogem ACTH. Zlatým standardem je pak výše zmíněný test s inzulínem. Při pituitární apoplexii, která vzniká většinou právě při přítomnosti adenomu, může dojít k hypopituitární krizi. V popředí klinického obrazu je typicky bolest hlavy, porucha vidění s výpadky zorného pole, paréza okohybných nervů s diplopií, psychické změny a projevy hypopituitarismu. Diagnózu potvrdíme CT nebo lépe MR. Klinicky je u hypopituitární krize přítomna nauzea, zvracení, svalová slabost, hypotenze s kolapsy, hypotermie a hypoventilace. V rozvinutém stavu pak dochází k poruše vědomí – soporu nebo hypopituitárnímu kómatu. Léčbu zahajujeme i bez laboratorního potvrzení diagnózy u centrálního hypokortikalismu. Dynamické testy provádíme až po stabilizaci nemocného. Léčba spočívá v substituci příslušného hormonu, infúzní terapii, podání glukózy.

Substituci tyroxinem zahajujeme až za 12 hodin po podání hydrokortisonu. Základním principem je substituovat jen ty deficity, které skutečně existují. Po operaci je nutno nemocné zajistit substitucí kortikoidy, vždy však musí následovat endokrinologické vyšetření, které často prokáže, že kortikotropní osa není poškozena.^{52,53}

2.5.4 Oftalmologické vyšetření

Chiasma opticum a optický trakt jsou velmi náchylné k poškození kompresí expandující pituitární masy. Nejčastěji dochází k bitemporálnímu výpadku zorného pole, zejména v jeho horní části. Každý pacient s hypofyzárním tumorem by měl podstoupit vyšetření perimetru u oftalmologa, pokud není tumor vzdálen od chiasmatu na MRI. Zhodnocení perimetru předoperačně pak poslouží i k pooperačnímu sledování.

2.6 Léčba

Postoj ke zcela afunkčním incidentalomům hypofýzy je v současné době konzervativní – vyčkávací. Je předpoklad, že většina těchto náhodně zachycených lézí nebudou karcinomy. Riziko růstu incidentalomu v čase je malé.^{12, 49} Napovídá tomu i fakt, že mezi celkovým počtem 12 411 hypofýz z pitevních studií byl průměrný záchyt adenomu 11,3 % a mimo 3 byly vše mikroadenomy. Relativní absence makroadenomů tedy nasvědčuje, že pravděpodobnost růstu a přeměny mikroadenomu na makroadenom je vzácná.⁵⁴ Ačkoli studie s přirozeným průběhem incidentalomů nebo makroadenomů, které nebyly z různých důvodů operovány, se liší v mnoha aspektech, je udáván růst incidentalomu v čase ve 3,2–12,5 %. Oproti tomu makroadenomy rostou až v 50 % (Tab. 2).^{1, 54-56} Šance, že makroadenom poroste na rozdíl od mikroadenomu, narůstala s časem.⁵⁴ Riziko růstu incidentalomů je malé, ale i tak nás nutí tyto nemocné dispenzarizovat. Zhodnocení endokrinních funkcí je vhodné po půl roce, neboť endokrinní funkce zbylé tkáně může být ohrožena rostoucím tumorem.⁵⁵ Častost kontrol je však stále předmětem diskuzí. Magnetickou rezonanci je vhodné udělat do roka.³² Na pracovišti III. interní kliniky 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze provádějí kontroly u nálezů menších než 10 mm ne dříve než za 1 rok, a nedochází-li k růstu, poté za 2 roky a následně za 5 let.¹² Honegger a kol. u incidentalomů a asymptomatických KAA doporučuje s ohledem na exponenciální model růstu kontrolní MRI po 1 roce a není-li zvětšení tumoru, tak po 3 a více letech.⁵⁷ U asymptomatických makroadenomů je strategie

"watch-and-wait" diskutabilní. Pro KAA projevující se příznaky z útlaku je primární volbou transsfenoidální resekce adenomu.

Tabulka 2 Incidence zvětšení neléčeného náhodně zachyceného makroadenomu

	Počet pacientů	Průměrná doba sledování v měsících	Asymptomatické zvětšení tumoru	Symptomatické zvětšení tumoru	Celkem (%)
Reincke et al (1990) ⁵⁸	7	22	2	0	2 (29)
Donovan et al (1995) ⁵⁹	16	76	3	2	5 (31%)
Nishizawa et al (1998) ⁶⁰	28	67	0	2	2 (7%)
Feldkamp et al (1999) ⁵⁶	19	32	3	3	6 (31.6%)
Fainstein Day et al (2005) ⁶¹	7	38	1	0	1 (14%)
Arita et al (2006) ⁶²	37	62	9	10	19 (51%)
Dekkers et al (2007) ⁶³	28	85	4	10	14 (50%)
Karavitaki et al (2007) ⁵⁴	24	42	4	8	12 (50 %)
Celkem	166		26 (15,6 %)	35 (21,1 %)	61 (36,7 %)

převzato s doplněním z Greenman et al., Non-functioning pituitary adenomas, 2009¹

2.6.1 Chirurgická léčba

Makroadenomy a expanzivní nádory projevující se příznaky z útlaku okolních struktur, vyžadují neurochirurgickou intervenci.⁴⁹ První transsfenoidální resekci hypofyzárního tumoru provedl v roce 1907 Herman Schloffer. Na Chirurgické klinice Univerzitní nemocnice v Innsbrucku operoval 30letého muže z Prahy se šestiletou anamnézou těžkých bolestí hlavy, hypogonadismem a pouze zbytky zraku.⁶⁴ V další dekádě Harvey Cushing popularizoval tuto techniku a do dnešní doby byla technika stále zdokonalována.³⁷ V současné době je preferován transsfenoidální přístup a využití endoskopických technik v kombinaci s neuronavigací. Transkraniální přístup je rezervován pro objemné masy umístěné supraselárně.^{32, 65} Cílů operačního zákroku je několik. Je nutné eliminovat tlak nádorové masy na hypofýzu a okolní struktury, uchovat či zlepšit poškozenou hormonální sekreci z hypofýzy, zachovat či zlepšit zrakové a neurologické funkce a odstranit tumor celý nebo pokud možno jeho co největší část k zabránění recidivy. V posledních letech se rozvíjí techniky s využitím MR během operace k posouzení rozsahu neurochirurgického výkonu. Je možné využít nízko magnetické intraoperační MR systémy s vyšší mobilitou

nebo MR s vysokým magnetickým polem, nižší mobilitou, ale lepší zobrazovací kvalitou. Od roku 2008 se intraoperační MR (iMR) používá i na pracovišti v Ústřední vojenské nemocnici v Praze Střešovicích.⁶⁶

2.6.1.1 Úspěšnost chirurgické léčby

Již předoperačně je nutné stanovit si předpokládaný rozsah výkonu. S ohledem na časté šíření mimo intrasellární oblast je nutné rozhodnout, zda půjde o zákrok radikální nebo jen parciální resekci. V případě předpokládané radikální resekce byla na pražském pracovišti úspěšnost 69 % a po zavedení iMR se díky zjištěnému neočekávanému reziduu podařilo zákrok radikalizovat v dalších 22 %.⁶⁶ Na Neurochirurgické klinice FN Hradec Králové bylo za léta 2000–2007 reziduum přítomno u 46 % nemocných operovaných pro KAA.⁶⁷ Perioperační mortalita je minimální – do 1 %^{66, 68}. Po operaci můžeme pozorovat zlepšení (v 60–85 %), nebo dokonce normalizaci (v 30–50 %) zrakového pole^{32, 69}. Zlepšení deficitní hormonální sekrece, která je způsobená útlakem zdravé hypofyzární tkáně, je méně časté. Dvě velké studie udávají zlepšení v 32,8 a 64,9 % případů v gonadální ose, v 41,6 a 71,9 % případů v ose adrenální a v 35,7 a 33,9 % v ose tyreoidální.^{68, 70} Dle radikality výkonu může naopak dojít i k prohloubení hormonální insuficience.^{71, 72} Po operaci je nutné nemocného sledovat a vyšetřit jeho hormonální funkce. V případě deficitu je na místě substituční léčba. Nutné je vyšetření perimetru. První zobrazovací vyšetření děláme v odstupu nejméně 3 měsíců pro postoperační změny v oblasti selly.⁷³

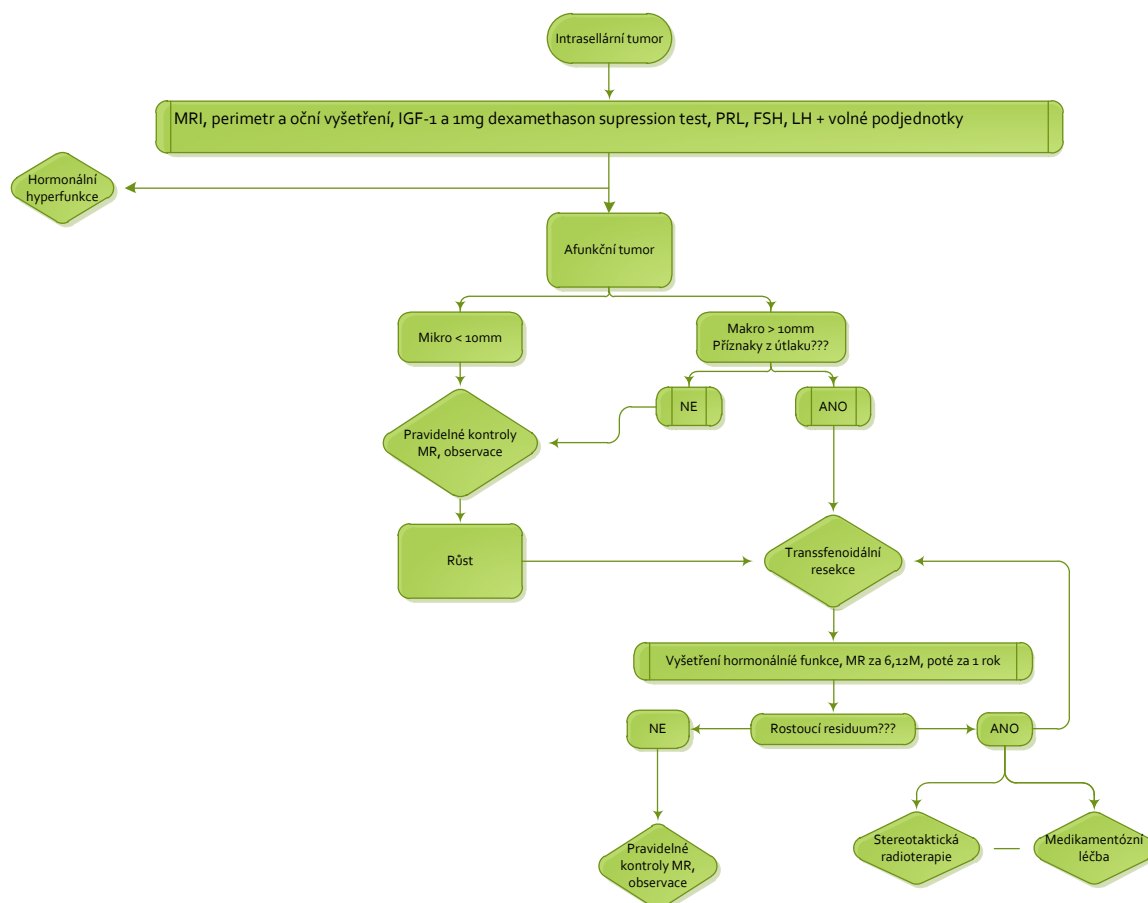
2.6.1.2 Rekurence a prediktory remise

K úplnému odstranění vede samotná operace makroadenomů málokdy a často zůstává reziduum. K recidivě růstu nádoru dochází v 11 až 46 %.^{74, 75} Bez známek rekurence tumoru zůstává 5 let po operaci asi 80 % nemocných. Vyšší hodnoty 87 % je dosaženo při zdánlivě kompletním odstranění, při ponechaných zbytcích klesá na 68 %.⁷⁶ Signifikantně horší výsledky jsou u nemocných s invazí především do kavernózního sinu a velkých tumorů s expanzí suprasellárně. Přesvědčivý marker pro zhodnocení rizika recidivy však nebyl dosud objeven. Například v retrospektivní analýze Brochiera u 142 pacientů operovaných pro KAA došlo k relapsu v 5 letech u 25 % pacientů, do 10 let u 43 % a do 15 let u 61 % pacientů. Z toho došlo k relapsu u 24 % pacientů, kteří měli zdánlivě kompletní resekci tumoru a u 47 % s inkompletní resekci. Riziko relapsu bylo signifikantně vyšší u tumorů s invazí do kavernózního sinu a u plurihormonálních adenomů a tichých kortikotropních adenomů oproti adenomům gonadotropním a null-cell adenomům.⁷⁷

Jihokorejští autoři ve své práci s 35 nemocnými operovanými pro KAA pozorovali rekurenci u 16 nemocných do 4 let, u 10 za více než 4 roky a u 9 nedošlo k rekurenci vůbec. U tumorů s rekurencí bylo vyšší procento Ki-67 (proliferativní index) pozitivních buněk a vyšší TUNEL pozitivita (apoptotický index).⁷⁸ Indexy proliferace a apoptózy spolu ovšem většinou korelují. Jak bylo vidět v práci našich kolegů s akromegalickými adenomy, snižoval somatostatin jak proliferaci, tak apoptózu.⁷⁹ Studií hodnotících index Ki-67 jako relevantní marker proliferace, kdy jeho čtenější výskyt byl spojen s aktivnějším růstem či vyšším procentem recidivy, je více.^{80, 81} Jsou i práce s protichůdnými výsledky, kdy vyšší proliferační aktivita nebyla spojena s častějšími recidivami a rychlejším růstem.^{82, 83} Ani na našem pracovišti neprokázal Česák a kol. závislost rychlosti růstu KAA a proliferačního indexu.⁶⁷ U rekurentních tumorů byla dále pozorována vyšší exprese markerů asociovaných s buněčnou proliferací – fosfoAkt a fosfoMAPK aktivační cesta, a naopak měly nižší expresi fosfoCREB (phospho cAMP response element binding) a ZAC1 (PLAGL1 – polyclonal pleiomorphic adenoma gene-like 1). Exprese ptpgl pozitivně koreloval s rekurencí.⁷⁸ Lepší porozumění expresním profilům těchto markerů by mohlo umožnit predikci rekurence těchto tumorů. Nicméně nebyl nalezen ukazatel, který by v individuálním případě dokázal rozhodnout, kterého nemocného například ozářit.

2.6.1.3 Komplikace

Komplikace neurochirurgické léčby jsou minimální, v méně než 5 %.⁶⁸ Jsou přímo závislé na zkušenostech neurochirurga. Poměrně často se vyskytují transientní minerálové poruchy – asi u 75 % případů. Častější než hyponatrémie (21 %) je diabetes insipidus (38.5 %).⁸⁴ Diabetes insipidus se objevuje nejvíce již 1. pooperační den a zmizí ve většině případů do 10 dní. Hyponatrémie se objevuje ke konci prvního týdne po operaci a přetrvává asi 5 dní. Většinou jde o poruchy mírné. Léčbu desmopressinem dlouhodobě vyžaduje jen velmi malé procento pacientů.⁸⁴ Dalšími komplikacemi může být zhoršení zrakových funkcí (0,5–2,4 %), krvácení (0,8–2,8 %), likvorea (1,5–4,2 %), meningitida (0,2–1,9 %), poranění karotidy (0,4–1,4 %) nebo oftalmoplegie (0,4–1,9 %).^{1, 68}



Obrázek 1 Schéma přístupu k intraselárnímu tumoru (navrženo dle Jaffe CA, Clinically non-functioning pituitary adenoma. 2006)⁴⁹

2.6.2 Radioterapie

Radioterapie je jednou z možností snížení rizika recidivy tumoru. Je také využívána jako léčebná modalita v případech, kdy nelze použít chirurgickou nebo medikamentózní léčbu. Dnes se již vyhýbáme konvenčnímu frakcionovanému ozáření. Účinek se dostavuje s dlouhou latencí a je zde významné riziko vzniku hypopituitarismu v jedné nebo ve více osách vznikající po 10 letech sledování u 50–80 % ozářených.⁸⁵ Počet nemocných s hypopituitarismem také narůstá s časem, kdy se po 5 letech objevil hypopituitarismus u 29 %, po 10 letech u 54 % a po 15 letech u 58 % ozářených.⁸⁶ Méně časté jsou další vedlejší účinky záření při zasažení zdravé mozkové tkáně se všemi důsledky – neuropatie optiku, radionekróza, poškození cévního zásobení.⁸⁷ Vedle toho takové záření vyžaduje více návštěv, a je tak pro pacienta méně pohodlné. Je tu navíc 1 % riziko sekundárních intrakraniálních tumorů.^{88, 89} Někteří autoři udávají až 2,4 % v intervalu 20 let pro konvenční frakcionované ozáření.⁹⁰ Preferována je stereotaktická radioterapie – Leksellův

gamma nůž nebo alternativně stereotaktický lineární urychlovač, zejména pro menší množství nežádoucích účinků, tumor však musí být v dostatečné vzdálenosti od zrakové dráhy.^{87, 91} I u použití Leksellova gamma nože je popsána incidence hypopituitarismu mezi 0 až 40 %, v sérii pražského pracoviště pak v prvních letech provozu 38 %.⁹² V další práci stejného pracoviště bylo potvrzeno, že vznik hypopituitarismu závisí na dávce, kterou je okolní hypofyzární tkáň zasažena. Jako bezpečnou doporučují dávku do 15 Gy. V souboru nemocných došlo po 5letém sledování při ozáření dávkou okolní tkáně do 15 Gy ke vzniku hypopituitarismu v 2,2 %, u dávky větší než 15 Gy pak v 55 %.⁸⁷ V literatuře je pak zmiňována používaná dávka záření 12–20 Gy, s optimální dávkou mezi 14–18 Gy.⁹³ Nejcitlivější k ozáření se jeví osa růstového hormonu, za ní následuje osa gonadální, adrenokortikální a TSH. Názory na použití radioterapie po operaci pro KAA jsou rozporuplné. Je pravdou, že některé práce poukazují na nižší výskyt recidivy po operaci (0–36 %) než v případě neozářených pacientů (6–46 %), zejména u prokazatelných reziduí.^{32, 93} Záření však recidivě nedokáže zabránit,^{69, 94} proto někteří autoři zastávají i vyčkávací postup.

2.6.3 Medikamentózní léčba

V posledních letech se využitím dopaminových (DA) a somatostatinových analogů (SSA) a s příchodem novějších preparátů znovu otevřela diskuze o medikamentózní léčbě KAA, především jako prevence recidivy onemocnění. Jejich úloha však zatím není přesně určena.

2.6.3.1 Dopaminergní agonisté

Dopaminergní agonisté (DA) byli objeveni v 70. letech. Dopamin se váže na všechny podtypy dopaminových receptorů. Bromokriptin z 1. generace DA se preferenčně váže na D2-like receptory, ačkoliv je také schopen vázat i D1-like. Quinagolid je jediný neergolinový DA s větší afinitou pro D2R. Kabergolin, DA s prodlouženým účinkem, váže stejně jako bromokriptin rovněž obě skupiny receptorů, ale s vyšší afinitou a větší selektivitou pro D2-like (Tab. 3).⁹⁵ Navíc jde o agonistu s delším poločasem. Využití DA k léčbě bylo založeno na faktu, že v hypotalamo-hypofyzárním systému dopamin blokuje cestou dopaminových receptorů sekreci prolaktinu (PRL).^{96, 97} Inhibice sekrece PRL, snížení jeho hladin v periferní krvi, a ve většině případů zmenšení až vymizení prolaktinomu pomocí aktivace D2 receptorů dopaminergními agonisty, se stala u prolaktinomů terapií volby.⁹⁸ Na základě dat o přítomnosti D2R i u KAA byl zkoumán efekt léčby DA *in vitro* a *in vivo*. Přehled výsledků jednotlivých studií lze nalézt v tabulce

níže (Tab. 4). Většina prací byla provedena s bromokriptinem. Ke zmenšení tumoru při léčbě bromokriptinem docházelo sporadicky a při vyšších dávkách léku.⁹⁹ Při použití quinagolidu došlo k zmenšení tumoru v 20 % a stabilizaci tumoru v 60 % případů. Méně výsledků je pak dostupných pro novější DA – kabergolin, který je ale u prolaktinomů účinnější a lépe tolerován než bromokriptin.^{100, 101}

Tabulka 3 Farmakologický profil dopaminových receptorů

	D2							
	D2 short		D2 long		D3		D4	
	Emax (%)	IC50 (nM)	Emax (%)	IC50 (nM)	Emax (%)	IC50 (nM)	Emax (%)	IC50 (nM)
Dopamin	100	350	100	320	100	11	100	100
bromokriptin	41	4,5	28	3,9	68	4,2	0	1000
kabergolin	102	0,53	75	0,41	86	0,78	49	81

Emax = maximální účinnost kalkulovaná jako procento maximální účinnosti koncentrace dopaminu; IC 50 - koncentrace navozující 50 % inhibice. Převzato z Pivonello, Novel insights in dopamine receptor physiology. 2007⁹⁵

Při léčbě kabergolinem v dávce 3mg/týden došlo ke zmenšení velikosti tumoru o 25 % u celkem 56 % KAA sledovaných pacientů za jeden rok.¹⁰² Ke zmenšení KAA došlo dle přehledové práce Colao⁹⁹ při léčbě DA kumulativně ve 30 %. Samotné výsledky jsou však rozporuplné. Ke zlepšení poškození zrakového pole došlo ve 20 %. Výsledky zlepšení mohou být ještě vyšší, neboť v pracích je kalkulováno i s pacienty bez zrakových obtíží.⁹⁹ K růstu tumoru došlo při léčbě DA pouze v 8 %, výsledek je ale limitován krátkou dobou sledování. Využití medikamentózní léčby se předpokládá po operaci. Vzhledem k tomu se doporučuje, aby v operačních vzorcích byla stanovena exprese D2 a aby byla v pooperačním průběhu tomuto nálezu věnována pozornost.⁹⁹ Důležitým a dosud neznámým zdrojem by byl nástroj k predikci odpovědi tumoru na léčbu DA. V práci Pivonella bylo zjištěno, že exprese D2 signifikantně koreluje s odpovědí na podání kabergolinu.¹⁰² Hodnocena byla i korelace zobrazovacích metod. Zobrazení D2 je možné pomocí „single-photon emission computed tomography“ (SPECT) za použití 123I-S(-)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-hydroxy-3-iodo-6-methoxybenzamidu (123I-IBZM) nebo při použití obdobné molekuly 123I-epidepridu.¹⁰³ Lepších výsledků bylo dosaženo s 123I-epidepridem. Možnost využití 123-I epidepridu ani 123-I-IBZM jako prediktivního faktoru léčby DA pro klinické použití se však nepotvrdila.^{104, 105} Další možností je zobrazení pomocí PET s antagonisty D2 označenými uhlíkem C11 jako 11C-N-rakloprid a 11C-N-methylspiperon. Studie byly provedeny zejména u prolaktinomů a GH-secernujících adenomů. Prokázán byl vyšší záchyt farmaka u adenomů reagujících na

terapii oproti rezistentním. U KAA byl celkově pozorován nižší záchyt než u prolaktinomů.⁴³ Vzhledem k tomu, že do dnešního dne není znám prediktor invazivity či růstu nádoru po operaci, zůstává preventivní léčba dopaminergními agonisty předmětem debat. Někteří autoři se přiklání k rutinnímu použití.¹⁰⁶ To však nelze obecně doporučit, stejně jako v případě radioterapie. Nevýhodou je, že medikamentózní terapie musí být často celoživotní.

Tabulka 4 Přehled výsledků studií s dopaminovými agonisty u klinicky afunkčních adenomů

Autor (rok vydání)	Zrakové pole			Velikost tumoru			Typ agonisty	Léčba Dávka (ug/den)	Délka léčby (v měsících)
	zlepšeno	stejně	zhoršeno	rostoucí	nezměněna	zmenšena			
Johnston et al. (1981)				0/1	0/1	1/1	BRC	20	25
Wollesen et al. (1982)				0/11	2/11	9/11	BRC	15-60	2 - 33
Wass et al. (1982)				0/1	0/1	1/1	BRC	7,5	4
Barrow et al. (1984)				0/12	6/12	6/12 b	BRC	7,5	1,5
Grossman et al (1985)				0/15	15/15	0/15	BRC/mesulergine/pergolide		3-36
Pullan et al. (1985)	1/5	4/5	0/5	0/5	4/5	1/5	BRC	15-37,5	10
Verde et al. (1985)	1/20	15/20	4/20	0/20	19/20	1/20	BRC	7,5-20	1-30
Zarate et al (1985)				0/7	7/7	0/7	BRC	15-22,5	0,5-12
Vance et al. (1985)	1/0	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	BRC		
D'Emden a harrison (1986)	3/3	0/3	0/3				BRC	7,5	1-3
Bevan et al. (1986)				0/8	8/8	0/8	BRC	5-40	4-12
Klibanski et al (1988)				0/4	2/4	2/4	BRC	2,5-10	1,5
Van Schaardenburg et al. (1989)	1/25	23/25	1/25	1/25	20/25	4/25	BRC	5-22,5	18
Hedner a valdermarsson (1989)	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	Q	0,3	3
Ferone et al. (1998)				0/6	4/6	2/6	Q	0,6	6-12
Garcia-Luna et al (1989)	1/1	0/1	0/1				LAR		
Abs et al. (1991)	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	Parlodel-LAR		
Kwekkeboom a Lamberts (1992)	2/5	3/5	0/5	0/5	4/5	1/5	Q	0,3	12
Nobels et al. (2000) ¹⁰⁷	0/10	6/10	4/10	6/10	4/10	0/10	Q	0,3	36-93
Colao et al. (2000)	3/10	7/10	0/10	0/10	8/10	2/10	Q or CAB		
Giusti et al (2000)				0/1	1/1	0/1	CAB		
Lohmann et al. (2000)	2/13	11/13	0/13	0/13	6/13	7/13	CAB	1	12
Pivonello et al. (2004)	4/9	5/9	0/9	3/9	1/9	5/9	CAB	1-3	12
Greenman et al. (2005)				7/33	15/33	11/33	BRC	5-10	12
de Herder et al. (2006)				0/18	7/18	11/18	Q/CAB	150-300	89,7
	21/104	74/104	9/104	17/217	134/217	66/217			
celkem	20 %	71 %	9 %	8 %	62 %	30 %			

Převzato s doplněním dle Colao, A. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas (2008)⁹⁹

BRC = bromokriptin, Q = quinagolid. CAB = kabergolin, LAR = dlouhodobě působící bromokriptin

2.6.3.1.1 Nežádoucí účinky

U podávání dopaminergních agonistů nelze opomenout v poslední době verifikované negativní účinky dlouhodobého podávání větších dávek. Schade,¹⁰⁸ z vědeckého registru ve Velké Británii, potvrdil signifikantní zvýšení rizika poškození trikuspidální chlopně s následnou trikuspidální regurgitací při podávání více než 3 mg pergolidu či kabergolinu na rozsáhlé skupině nemocných s Parkinsonovou chorobou. K obdobným závěrům došel i Zanettini.¹⁰⁹ Na základě těchto dat byly provedeny studie nemocných s prolaktinomy,¹¹⁰⁻¹¹⁵ kdy 3x zvýšená prevalence středně závažné trikuspidální regurgitace byla prokázána pouze v jedné studii,¹¹⁵ ve dvou byla regurgitace méně závažná. Ostatní srdeční chlopně vyšším rizikem zatíženy nebyly. Negativní účinky se projevují při vyšších dávkách a nevyskytují se u preparátů neodvozených od ergotaminu. Což je v souladu s hypotézou, že za změnami chlopně stojí vazba kabergolinu na serotoninový (5-hydroxytryptamin 2B) receptor, který způsobuje mitogenezi a zmnožení fibroblastů.¹¹⁶ Ostatní negativní účinky DA jsou dobře známé a jsou shrnuty v práci Gillamové. V zásadě je lze rozdělit do 3 skupin: 1) gastrointestinální obtíže – nejčastěji nauzea, zvracení, zácpa, 2) kardiovaskulární – posturální hypotenze a 3) neurologické – bolesti hlavy a ospalost.⁹⁸

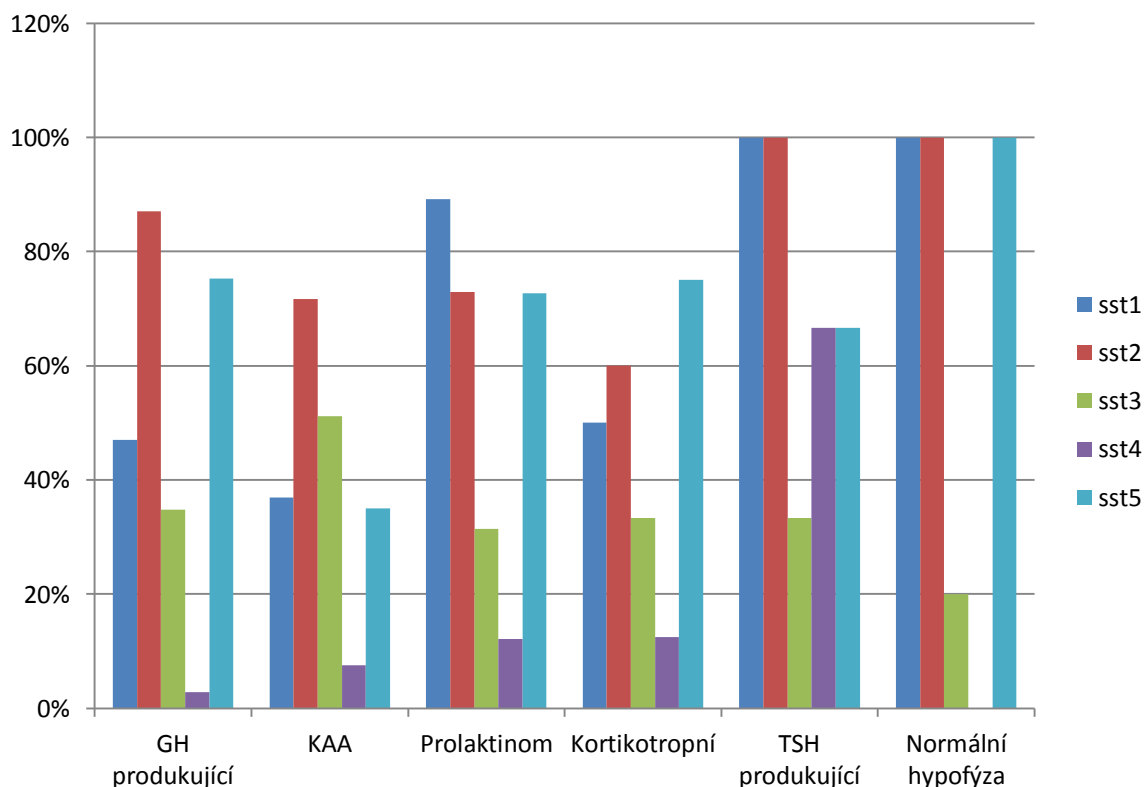
2.6.3.2 Somatostatinová analoga

Somatostatin je cyklický polypeptid přítomný v lidském těle ve dvou formách. Jedna o délce 14 a druhá o délce 28 aminokyselin. Tyto aktivní formy hormonu vznikají štěpením jeho prekurzorové formy. Somatostatin je produkován v CNS, gastrointestinálním traktu, játrech, slinivce, plicích i nadledvinách. S ohledem na šíři distribuce se liší i jeho účinek, který je ale vždy primárně inhibiční na endokrinní i exokrinní sekreci. V hypofýze tlumí sekreci GH, ale i TSH, ACTH a prolaktin.¹¹⁷ Somatostatin a somatostatinová analoga (SSA) působí přes somatostatinové receptory (SSTR) spřažené s G-proteinem. Všech 5 subtypů je přítomno v hypofýze a v hypofyzárních tumorech, i když SSTR4 spíše vzácně.¹¹⁸ SSTR2 má navíc 2 podtypy – SSTR_{2A} a SSTR_{2B}, které vznikají alternativní potranskripční modifikací mRNA (splicing - sestřih). SSTR_{2B} však není u lidí téměř přítomen.¹¹⁹ U KAA se setkáme s vyšší expresí podtypu 3 (SSTR3) a SSTR2.¹²⁰ Ostatní podtypy jsou zastoupeny méně.

S ohledem na negativní efekt na hormonální sekreci v adenohypofýze jsou SSA využívána v terapii akromegalie a neuroendokrinních tumorů. V současné době užívaná SSA jsou depotní formy octreotidu (Sandostatin LAR®, aplikace 1x za 4 týdny) a lanreotidu

(Somatuline PR®, aplikace 1x za 10–14 dní a Somatuline autogel® s aplikací 1x měsíčně). Tato SSA mají největší afinitu pro SSTR2, 10–20x nižší pro SSTR5 a ještě nižší pro SSTR3. Zdá se, že právě afinita jednotlivých SSA hraje klíčovou roli ve výsledném účinku na buňky tumoru. S octreotidem provedené studie u KAA mají rozporuplné výsledky a ne tak dobré jako u GH secernujících adenomů. V porovnání s dopaminovými agonisty dochází k redukci tumorózní masy u KAA při použití SSA pouze ve 12 %⁹⁹. Růst tumoru nelze zcela přesně hodnotit vzhledem k velmi krátké době sledování, ale docházelo k němu asi v 5 %. Lze předpokládat ovšem hodnotu vyšší. Zajímavý je dosud nevysvětlený příznivý rychlý účinek na bolesti hlavy a zrakové obtíže, který si Lamberts vysvětluje přímým efektem na sítnici a zrakový nerv¹²¹. Vzhledem k převaze SSTR3 v KAA je možné, že další analog pasireotid s vazbou na SSTR1-3 a SSTR5 by mohl mít větší efekt. Mechanismus účinku pasireotidu u KAA na růst tumoru se předpokládá v inhibici cévního endotelového růstového faktoru právě cestou aktivace somatostatinových receptorů¹²².

Graf 1 Procento jednotlivých typů somatostatinových receptorů SSTR1-5 dle míry exprese jejich mRNA v hypofyzárních adenomech. Zobrazeno dle dat z Hofland/Lamberts, 2004¹²³
V grafu je patrné vyšší zastoupení SSTR3 a menší exprese SSTR5 než u ostatních.



2.6.3.2.1 Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky se vyskytují u 20–40 % nemocných. Hlavním nežádoucím účinkem SSA jsou gastrointestinální obtíže. Na počátku terapie se objevuje meteorismus, průjmy nebo alespoň řídká stolice, bolesti břicha, nauzea a zvracení. Trvají několik dní po injekci a při pokračování v terapii se většinou zmírňují. Vznik žlučnickových kamenů byl popsán v 15 % případů, většinou v prvním roce terapie. Méně často se vyskytuje bolest v místě vpichu. Somatostatin inhibuje sekreci inzulínu a terapie může zhoršit glukózovou toleranci, nebo manifestovat diabetes.^{124, 125}

2.6.3.3 Kombinovaná léčba

Vzhledem ke koexpresi obou typů receptorů a se znalostí homodimerizace a heterodimerizace somatostatinových receptorů¹²⁶ a současně s vědomím o heterodimerizaci SSTR5 a D2¹²⁷ se otevírá cesta k novým terapeutickým možnostem. Heterodimerizace způsobuje větší afinitu pro dopaminová i somatostatinová analoga a je spojena s větším vlivem G proteinu na adenylátcyklastu.¹²⁷ Dalo by se tedy předpokládat, že ovlivnění obou typů receptorů pomocí kombinované léčby bude mít lepší účinek. Kombinovanou léčbou se zde rozumí léčba multireceptorovými ligandy nebo chimérickými molekulami s afinitou pro somatostatinový a dopaminový receptor („dopastatin“). Nejvíce dat s kombinovanou léčbou je dostupných pro akromegalii, kdy přehlednou práci publikoval kolektiv Colao.¹²⁸ Pro KAA je celkově k dispozici zatím velmi málo dat. *In vivo* studii s kombinací DA a SSA provedl Andersen, který sledoval pacienty 6 měsíců na kombinaci octreotidu (200 ug 3xd) a kabergolinu (0,5 mg/d).¹²⁹ Ke zmenšení tumoru o více než 10 % došlo u 6 pacientů z 10. Nové možnosti léčby se očekávají od dopastatinů. Klinická data pro KAA však zatím nejsou. Studie s dopastatinem BIM-23A760 Tulipia firmy Ipsen u akromegalie byla přerušena pro nedostatečný efekt a převažující dopaminergní efekt dopastatinu (viz. níže). V práci Gruzsky a kol. dopastatin BIM-23A387 *in vitro* inhiboval růst buněčné kultury u 6 z 10 KAA, což ale byl horší výsledek než s bromokriptinem samotným.¹³⁰ Pozitivní motivací k dalšímu výzkumu je výsledek práce Florio, v níž k inhibici růstu buněčné kultury KAA došlo v 60 %. Florio potvrdil, že dopastatin (BIM23A760 s afinitou k SSTR2, SSTR5 a D2R) působí opravdu přes oba typy receptoru současně¹³¹. Nebyl však *in vitro* účinnější než samotný kabergolin. Posléze Peverelli a kol. potvrdil, že BIM23A760 a dopaminergní agonista BIM-53097 významně inhibují buněčnou proliferaci KAA asociovanou se zvýšením exprese p27 a zvýšením aktivity kaspasy-3. K tomu docházelo

aktivací ERK1/2 a p38 nitrobuněčných drah. BIM23A760 tak má hlavně efekt zprostředkovaný přes D2R.¹³²

2.7 Těhotenství

Těhotenství není u žen s KAA obvyklé především pro častou poruchu sekrece gonadotropinů a/nebo hyperprolaktinémii. (viz. kapitola – klinický obraz). Spontánní těhotenství je tedy u KAA vzácné a obvykle vyžaduje indukci ovulace. Růst tumoru během těhotenství není rovněž obvyklý, neboť estrogení stimulace neovlivňuje KAA. Nicméně hyperplázie laktotropních buněk během těhotenství, která může zvětšit objem hypofýzy až na 136 % původního objemu nebo 12 mm na výšku, může činit problém. Při zvětšení může dojít k posunu tumoru a tlaku na optické chiasma s následnou poruchou zorného pole. Nemocná může být zaléčena dopaminovými agonisty, chirurgické řešení si necháváme pro nemocné nereagující na medikamentózní léčbu nebo pro případy, kdy dojde k hypofyzární apoplexii.^{133, 134}

2.8 Kvalita života (QoL)

Oproti nemocným s hormonálně aktivními tumory je o kvalitě života nemocných s KAA dostupných mnohem méně údajů. Nelze generalizovat ani výsledky prací, které hodnotily kvalitu života u hypofyzárních onemocnění. Ty zahrnovaly adenomy jak funkční, tak afunkční. KAA se liší od funkčních adenomů z více hledisek. Vyskytují se v pozdějším věku, operují se až makroadenomy s příznaky. S ohledem na pozdější záchyt makroadenomu je u KAA i častější výskyt nedostatku hormonální produkce některého z hormonů. U funkčních adenomů mohou přetrvávat důsledky předchozí hormonální nadprodukce.¹³⁵ Page et al.¹³⁶ pomocí obecného dotazníku „Medical Outcome Study Short Form-36“ (SF-36) hodnotil QoL u 48 pacientů po transsfenoidální resekci KAA v porovnání s nemocnými po operaci mastoidu. Mezi nemocnými a kontrolami ze zdravé populace, stejně tak mezi nemocnými s hypopituitarismem a neporušenou hypofyzární funkcí nenašel autor významný rozdíl. Obdobného výsledku se dobral u 109 pacientů s KAA i Nielsen et al.¹³⁷, který oproti předchozímu u pacientů s deficitem GH aplikoval substituci. Mezi pacienty s deficitem GH a substituční léčbou a pacienty s deficitem GH bez substituce nebyl rozdíl v QoL. Sníženou QoL v oblasti mentálního skóre pozoroval jen u nemocných po kraniotomii. Oproti výše zmíněným autorům popisuje Johnson ve své práci s 51 pacienty s KAA sníženou kvalitu života (hodnocenou dotazníkem SF-36) v oblasti fyzického i mentálního skóre.¹³⁸ Snížení QoL u nemocných po operaci KAA

zaznamenal Dekkers¹³⁵. QoL hodnotil u 99 nemocných s KAA oproti kontrolám z běžné populace a oproti kontrolám dostupným z literárních dat vztaženým na věk. Použity byly 4 dotazníky – "Hospital Anxiety and Depression Scale - HADS, Multidimensional Fatigue Index - MFI-20, SF-36 a Nottingham Health Profile - NHP." Nejvíce byla pacienty po operaci zmiňována zvýšená fyzická i psychická únava, nedostatek energie a snížena motivace. Nezávislým prediktorem pro sníženou QoL byl nedostatek jednoho a více hormonů.¹³⁵

3 Dopaminové receptory

Dopamin je jedním z hlavních katecholaminů a neurotransmiterů v lidském organismu. V centrálním nervovém systému (CNS) kontroluje velké množství funkcí, včetně lokomoce, kognitivních funkcí, emocí, příjmu potravy a endokrinních regulací. Najdeme ho i mimo CNS jako modulátor kardiovaskulárních a renálních funkcí, cévního tonu a gastrointestinální motility. Dopamin působí na dopaminových receptorech (DR), které patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteinem (G-protein-coupled receptor - GPCR).¹³⁹

3.1 Receptory spřažené s G-proteinem a mechanismus jejich akce

V roce 1994 obdrželi Alfred G. Gilman a Martin Rodbell Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu za objev a popis funkce GPCR. Receptory spřažené s G-proteinem tvoří největší rodinu membránových receptorů v lidském těle pro velké množství chemických i senzorických stimulů. Najdeme je téměř na všech buňkách. Poruchy funkce GPCR mají podíl na mnoha nemocech.¹⁴⁰ Skládají se ze 7 transmembránových domén α -helixové formace s N a C konci exponovanými extracelulárně a intracelulárně. S touto strukturou je asociován heterotrimerický G-protein složený z 3 podjednotek α a těsně vázaných β a γ . K přenosu signálu dochází po navázání specifického agonisty na GPCR. Následně se změnil konformace receptoru a dochází k přeměně GPCR z inaktivního do aktivního stavu. Zmobilizuje se přesun guaninového nukleotidu a výměna GDP na GTP na α podjednotce G-proteinu.¹⁴¹ Posléze dojde k disociaci α a $\beta\gamma$ podjednotek. Každá může samostatně spustit nebo inhibovat aktivitu efektorových enzymů (adenylátcyklasu, fosfodiesterasu, fosfolipázu) a iontových kanálů (K^+ , Cl^- , Na^+ , Ca). Iontové kanály pak ovlivní tok druhých posílů jako cAMP, cGMP, diacylglycerolu nebo inositoltrifosfátu, které ovlivňují mnoho intracelulárních signálních drah. Vlastní GTPázová aktivita α podjednotky katalyzuje vlastní inaktivaci celého GPCR do inaktivního stavu.

Do nedávné doby se myslelo, že GPCR existují a fungují pouze jako monomery. Prokázáno to bylo u rhodopsinového, β_2 adrenergního a μ -opiového receptoru.^{142, 143} Některé GPCR se však spojují a fungují jako homooligomery nebo heterooligomery. Do

této skupiny patří i receptory dopaminové. Ukázalo se, že oligomerizace ovlivňuje přenos signálu a funkci receptoru.¹⁴⁴ Prvky, které způsobují oligomeraci a stabilitu oligomerů nejsou zatím dobře prozkoumány i s ohledem na omezenou metodiku. U některých receptorů jsou jednotlivé monomery spojeny disulfidovými můstky, asociují se a fungují jako konstitutivní dimery. Mnoho dalších je však spojeno jen nekovalentními vazbami a jejich stabilita na dobu potřebnou k aktivaci G-proteinu nemusí být dostatečná. Dle posledních studií to vypadá, že mezi monomery a homodimery, konkrétně u D2R, existuje dynamická rovnováha.¹⁴⁵ Současně se zdá, že právě dysregulace heterodimerových GPCR může být podkladem pro některá onemocnění.

3.2 Klasifikace dopaminových receptorů

První zmínka o existenci DRR v CNS je z r. 1972, kdy biochemické studie prokázaly, že dopamin ovlivňuje adenylátcyklasu. Dnes víme, že dopamin má svoji nezastupitelnou úlohu v centrálním nervovém systému, periférii, ale i v systému endokrinním, kde jsou dopaminové receptory součástí systému regulace hypotalomo-hypofyzární-adrenální osy. DR patří do třídy A v rodině GPCR. DR dělíme na dvě hlavní skupiny: D1 receptoru podobné (D1-like) a D2 receptoru podobné (D2-like). Do první skupiny patří D1 a D5 subtyp DR. Do D2-like skupiny patří D2, D3 a D4 subtypy. Obě skupiny se liší svými vlastnostmi farmakologickými, biochemickými, funkčními i anatomickým rozmístěním. Jak již bylo zmíněno výše, lokalizací DR, kromě specifických oblastí CNS, je hypofýza, cévy, nadledviny, ledviny a srdce.¹³⁹ V hypofýze pak najdeme jen D2-like. Ve struktuře jsou si D1- a D2-like podobné na N konci. D1R a D5R mají na N konci 2 místa pro glykosylaci, D2R pak až 4 taková místa, D3R 3 a D4R 1 místo. Na C-konci je již rozdíl výraznější. D2-like mají 7x kratší C konec. Výrazný rozdíl je i na třetí nitrobuněčné kličce spojující transmembránové domény. U D2-like receptorů je 3 klička mnohem delší. Délka třetí nitrobuněčné kličky se dává do souvislosti s afinitou mezi receptorem a ligandem, kdy dochází k inhibici adenylátcyklasy a snížení produkce cAMP. Stejně tak dochází ke snížení nitrobuněčných hladin vápníku (inhibicí hydrolýzy fosfatidylinositolu). U D2-like receptorů je patrná aktivace draslíkových kanálů.¹³⁹

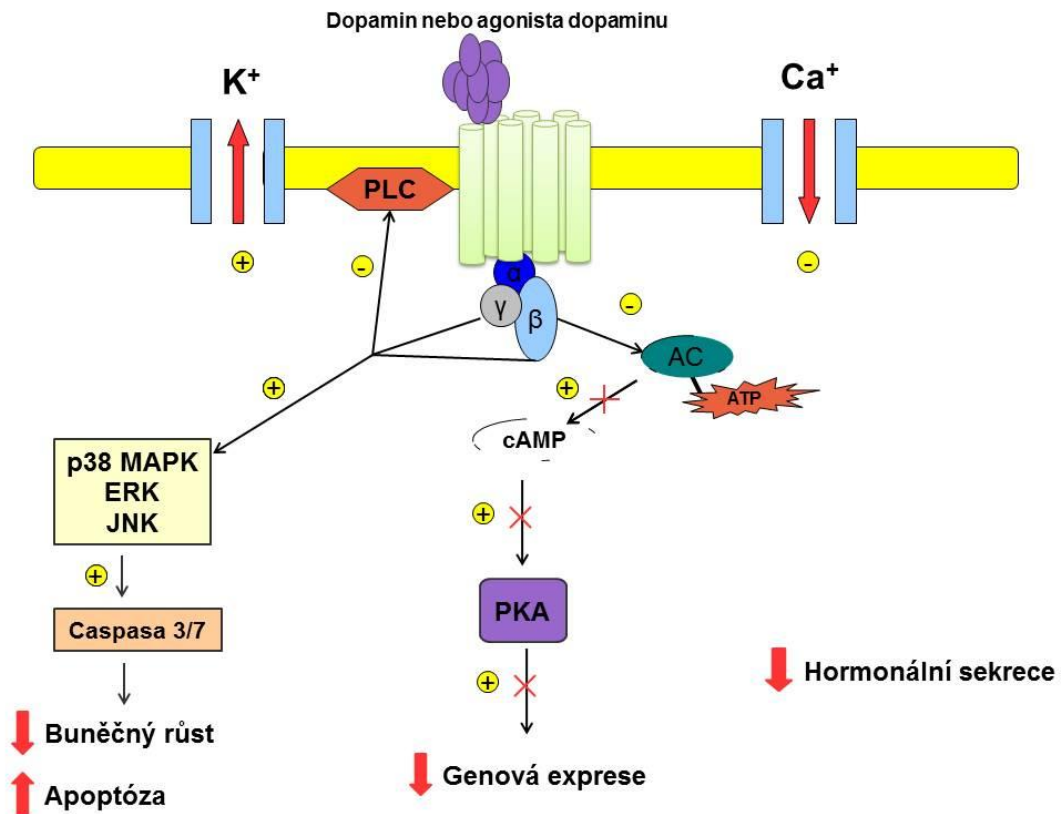
Mimo strukturální změny jsou mezi D1-like a D2-like skupinami i drobné farmakologické rozdíly, především v afinitě k jednotlivým agonistům a antagonistům, např. dopamin má 20x větší afinitu k D3 receptoru než k D2. Bromokriptin se pak preferenčně váže na D2-like receptory, ačkoli je schopen se navázat i na D1-like. Kabergolin má pak větší afinitu i selektivitu pro D2-like.⁹⁵ Samotný D2 má dvě isoformy, které se liší v řetězci 29

aminokyselin v již zmiňované třetí intracelulární kličce DA receptoru. Podle délky tohoto řetězce rozeznáváme krátkou (D2S) a dlouhou (D2L) izoformu. Zdá se, že kratší izoforma vykazuje větší aktivitu než izoforma dlouhá.^{102, 139, 146} Zda je to modifikací postreceptorové signalizace, není dosud zcela jasné.

3.3 Úloha dopaminových receptorů v hypofýze

Nejčastějším receptorem v hypofýze je D2R. Jeho přítomnost v hypofýze byla zjištěna poprvé pomocí radioligandů v 70. letech 20. století. D2R se nacházejí v předním a intermediárním laloku hypofýzy, v melanotropních a laktotropních buňkách. Zde zprostředkovávají inhibiční účinek dopaminu z hypotalamu na sekreci prolaktinu. V předním laloku je přítomen i D4 subtyp.^{147, 148} Pivonello uvádí až v 17 %.¹⁰² Jeho funkce není však zcela dobře prozkoumána¹⁴⁹. Aktivací D2R v hypofýze se spouští regulační mechanismy. Mimo zmiňovanou inhibici adenylcyklázy je ovlivněn metabolismus fosfatidylinositolu, jsou aktivovány draslíkové kanály a naopak inhibován L-typ a T-typ kalciových kanálů (Obr. 2).¹⁴⁹ Inhibice sekrece PRL, snížení jeho hladin v periferní krvi a ve většině případů také zmenšení objemu prolaktinomu pomocí aktivace D2R se stala terapeutickou možností k ovlivnění prolaktinomů, u kterých je léčba pomocí dopaminergních agonistů metodou volby.^{98, 150, 151} Kromě samotného snížení sekrece dochází i k redukci velikosti tumoru. Mechanismus účinku dopaminových analog není zcela objasněn. Bromokriptin i dopamin mají synergistický účinek v indukci apoptózy aktivací kaspasy 3/7. Oba však aktivují kaspasu jinou nitrobuněčnou kaskádou. Bromokriptin cestou aktivace p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), JNK a ERK.¹⁵² D2R negativně reguluje expresi genu pro proopiomelanokortin (POMC) v melanotropních buňkách. Hlavními produkty POMC genu jsou β -endorfin, α -MSH, avšak v kortikotropních buňkách je POMC přeměněn na ACTH. U D2R deficientních myší byla prokázána zvýšená exprese POMC, zvětšení středního laloku hypofýzy a nečekaně vysoké hladiny ACTH s odpovídajícím zvýšením hladiny kortikosteronu a adrenální hypertrofií jako u Cushingova syndromu.¹⁵³ Kromě fyziologické přítomnosti D2R na povrchu buněk zdravé hypofýzy a prolaktinomu byla prokázána přítomnost D2R i v GH-, ACTH- a TSH-secernujících tumorech.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Stejně tak u KAA¹⁵⁷. Několik studií prokázalo přítomnost míst vázících dopamin v KAA pomocí radioligandů¹⁵⁸ pomocí *in-situ* hybridizace hodnotila přítomnost D2R skupina kolem Rennera, která udává přítomnost D2R až v 89 %. Rozložení D2L a D2S je velmi heterogenní. Oproti normální hypofýze byla přítomnost

D2R stejná nebo o něco nižší. ¹⁴⁶ Pomocí RT-PCR v jedné ze studií udává Pivonello o



Obrázek 2 Cesty nitrobuněčné signalizace a s G proteinem spřaženého dopaminového receptoru. Po aktivaci dopaminového receptoru dopaminem nebo jeho agonistou je inhibována adenyl cykláza (AC), fosfatidylinositol, aktivovány draslíkové a snížena aktivita kalciových kanálů. Rovněž je modulována aktivita fosfolipázy C (PLC), aktivována mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK) s extracelulárním signálem regulovanou kinázou (ERK). α, β a γ – podjednotky G-proteinu. PKA protein kináza A. Převzato a upraveno dle Ferone et al., The clinical–molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology, Journal of Molecular Endocrinology, 2009

něco nižší expresi D2R (67 %), ale rovněž s predominancí D2L. ¹⁰² V roce 2009 zhodnotil kvantitativně expresi mRNA D2R u malého souboru 15 nemocných s KAA Tateno a kol., který jí porovnával s expresí u nemocných s Cushingovou chorobou a tichými kortikotropy. Míra exprese mRNA pro D2R byla u nemocných s Cushingovou chorobou i tichými kortikotropy významně nižší (1/200–300) než u nemocných s KAA ¹⁵⁹. Ve stejném roce pomocí kvantitativní real-time RT-PCR (qRT-PCR) hodnotil expresi mRNA D2R v KAA Neto. D2R a D4R byly přítomny u všech 30 vzorků. Přítomen byl D1R u 16,7 % vzorků a D5R u 36,7 % KAA, exprese však byla na hranici senzitivity PCR reakce. D3R nebyl přítomen. Neto hodnotil i 8 normálních hypofyzárních tkání od kadaverů, kde byla potvrzena přítomnost exprese D2R a D5R u všech vzorků, D1R v 37,5 % a D4R v 12,5 % vzorků. Opět však na hranici senzitivity reakce. Míra exprese D2R byla u normální tkáň

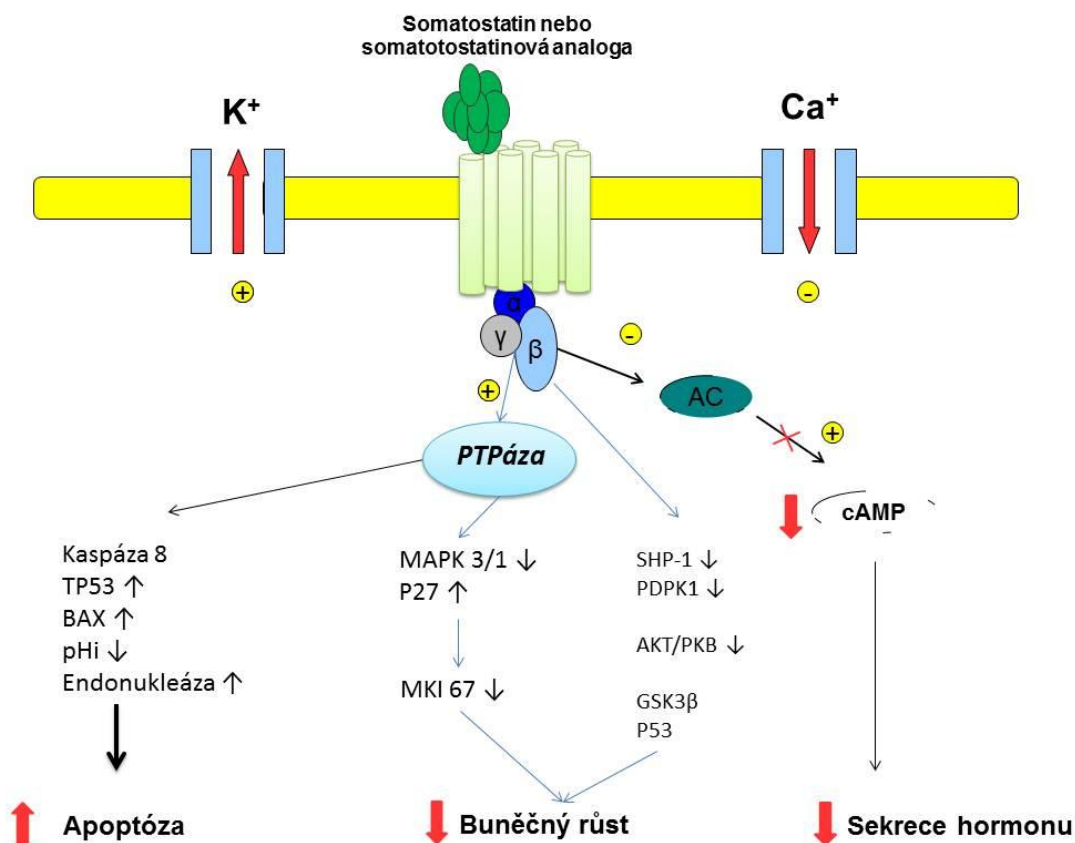
vyšší než u adenomů, ale při srovnání KAA s GH produkujícími adenomy byla míra exprese podobná.¹⁴⁸

Kromě exprese samotného D2R je u hypofyzárních adenomů koexprese dopaminových a somatostatinových receptorů. Studií hodnotících koexpresi v rámci jednoho typu adenomu není mnoho. U většiny z celkem 126 hodnocených KAA ve 3 pracích (30;38 a 58 KAA) byla zjištěna koexprese SSTR2, SSTR3 a D2R. Míra exprese však byla značně variabilní.^{131, 148, 160} Jak již bylo zmíněno výše, existují důkazy, že DR a SSTR receptory mohou tvořit heterodimery. Tvorba heterodimerů může mít vliv na vazbu, signalizaci a internalizaci těchto receptorů. Při spojení SSTR5 a D2R došlo k vytvoření receptorů s novou konformací a s vyšší aktivitou a větší schopností vazby jak DA, tak SSA.¹²⁷ Další důkaz pro heterodimerizace je u CHO-K1 buněk, u kterých byla navozena exprese D2R a SSTR2. Následně při léčbě DA i SSA docházelo k heterodimerizaci obou receptorů, což bylo demonstrováno metodou FRET (fluorescence resonance energy transfer). Došlo také k zvýšení afinity pro DA, zesílení signalizace a delší internalizaci SSTR2¹⁶¹ S ohledem na tato data, může mít koexprese obou receptorů vliv na citlivost buněk vůči DA a SSA.¹⁶²

4 Somatostatinové receptory (SSTR)

Somatostatin je polypeptidový hormon. Od jeho objevení v roce 1973 Guilleminem a Gericchem se znalosti o jeho účincích a mechanismech působení značně rozšířily.¹⁶³ Samotné aktivní formy somatostatinu vznikají proteolytickou aktivitou z prekurzorové molekuly – preprosomatostatinu a prosomatostatinu. Po rozštěpení vznikají dvě aktivní formy skládající se z řetězce 14 nebo 28 aminokyselin.¹¹⁹ Aktivní forma má mnoho fyziologických rolí včetně regulace endokrinní a exokrinní sekrece, modulace buněčné diferenciaci a proliferace.¹⁶⁴ Krom inhibice pankreatické a gastrointestinální sekrece, je somatostatin také známým inhibitorem sekrece růstového a tyreotropního hormonu z hypofýzy. Tyto biologické účinky jsou zprostředkovány přes somatostatinové receptory. SSTR známe 5 typů – SSTR 1–5. SSTR stejně jako dopaminové receptory patří do rodiny s G proteinem spřažených receptorů.¹⁶⁵ SSTR2 má navíc 2 podtypy – SSTR_{2A} a SSTR_{2B}, které vznikají alternativní potranskripční modifikací mRNA (splicing - sestřih). Mezi sebou se liší délkou cytoplasmatického konce. SSTR 1,2,3 a 5 se vyskytují jak u hypofyzárních adenomů, tak v normální hypofýze.¹²⁰ Oproti tomu SSTR 4 se v hypofyzárních adenomech nevyskytuje vůbec nebo je jeho exprese velmi nízká.¹²⁰ Nedávno Duran-Prado a kol. popsal v hypofyzárních adenomech existenci 2 nových zkrácených, ale funkčních forem SSTR5 nazvaných SSTR5-TMD4 a SSTR5-TMD5.¹⁶⁶ Jde o receptory s méně než 7 transmembránovými doménami (TMD – *transmembrane domain*). Tyto receptory nebyly přítomny v normální hypofýze. U SSTR5T-MD4 byla prokázána přítomnost v GH produkujících adenomech rezistentních na octreotid. Autoři spekulují o jeho možném vlivu na sníženou odpověď na SA pozorovanou u některých hypofyzárních adenomů.¹⁶⁷ Účinek somatostatinu a současně i jeho analog je ovlivněn především typem receptoru, přes který je uskutečňován. Geny pro jednotlivé typy receptorů jsou lokalizovány na různých chromosomech, což naznačuje nejen individuální transkripční kontrolu každého z nich, ale i jejich rozdílnou funkčnost. Recentní práce ukazují, že agonizace každého z těchto receptorů je skutečně spojena s aktivací rozličných signálních drah a rozdílnou buněčnou odpovědí. Společně všechny podtypy receptorů sdílejí aktivaci druhých posílů po navázání somatostatinu. Jde o inhibici sekrece adenylátcyklázy, inhibici kalciových kanálů, stimulaci fosfotyrosinové fosfatázy a MAPK.^{119, 165, 168} Inhibice adenylátcyklázy a kalciových kanálů má vliv především na

sekreční aktivitu. Oproti tomu u aktivace fosfotyrosinové fosfatázy a MAPK se předpokládá vliv na procesy související s buněčnou proliferací.¹¹⁹ Zajímavá je v tomto ohledu aktivace SSTR3, v menší míře SSTR2, specifickými ligandy vede k indukci apoptózy.¹⁶⁸ Důkazy mluví také o tom, že SSTR1 snižuje buněčný růst a angiogenezi a zvyšuje expresi p21. SSTR2 indukuje apoptózu mechanismem nezávislým na p53, a to nejspíše redukcí exprese proteinu Bcl-2, který účinkuje antiapoptoticky. SSTR3 spouští apoptózu aktivací nitrobuněčných druhých posílů cestou fosfotyrosinové fosfatázy, aktivací p53 a aktivací proapoptotického proteinu Bax. SSTR4 nemá zatím jasně definovanou funkci. SSTR5 pak zkracuje životní cyklus buněk cestou aktivace fosfolipázy C/IP3 a inhibuje sekreci GH aktivací adenylátcyklázy a draslíkových kanálů.¹⁶⁹ V souhrnu lze říci, že vnitrobuněčná signalizace u somatostatinových receptorů je děj složitý, zahrnující tedy několik druhých posílů – viz. obrázek 3. Který děj se nakonec uplatní, závisí nejen na typu receptorů, jejich rozdílné distribuci, ale i jejich možné internalizaci, desenzitizaci, heterodimerizace a cross-talku.^{119, 168} Všechny podtypy váží nativní somatostatin s vysokou afinitou. Afinita k oktapeptidovým somatostatinovým analogům je však rozdílná. SSTR1 a SSTR4 mají afinitu nízkou, naopak dobře je váží, ale s rozdílnou afinitou SSTR2,3 a 5. Ve vztahu k hypofyzárním tumorům byla exprese somatostatinových receptorů nejvíce hodnocena zejména u adenomů s nadprodukcí růstového hormonu.¹⁷⁰ SSTR2 a SSTR5 jsou zapojeny především do regulace uvolňování somatotropinu a TSH.¹⁷¹ SSTR5 pak i u PRL. V současné době používaná analoga somatostatinu, působící právě přes tyto 2 receptory, jsou používána jako medikamentózní léčba první linie u akromegalie, TSH adenomů a neuroendokrinních tumorů.¹⁷² Adenomy produkující v nadměrné míře GH predominantně exprimují právě SSTR2 a 5 jak na úrovni mRNA,^{123, 173, 174} tak na úrovni proteinu.¹⁷⁴ Míra exprese mRNA SSTR2 je velmi variabilní a korelovala *in vivo* se supresí sekrece růstového hormonu somatostatinovými analogy. Navíc se předpokládá, že kombinovaná aktivace SSTR2 a 5 má aditivní inhibiční efekt na supresi sekrece GH.^{173, 174}



Obrázek 3 Hlavní cesty nitrobuněčných signálních drah somatostatinových receptorů v hypofýzárních buňkách. Somatostatin nebo jeho analoga inhibují adenylátcyklasu (AC), aktivují draslíkové a inhibují kalciové kanály. Fosfotyrosinová fosfatáza a MAPK jsou pak dalšími modulátory nitrobuněčné signalizace a cestou druhých posílů dochází k apoptóze a inhibici buněčného růstu. Převzato a upraveno dle Ferone et al., The clinical–molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology, Journal of Molecular Endocrinology, 2009

V klinicky afunkční adenomech byly somatostatinové receptory hodnoceny s rozporuplnějšími výsledky než u akromegalie.^{99, 120} Nejvíce byl v klinicky afunkčních adenomech exprimován SSTR2 a SSTR3.^{120, 131, 162} Navíc účinnost léčby somatostatinovými analogy nedosahuje zdaleka výsledků jako u akromegalie či TSH adenomů (viz.výše – kapitola 2.6.3). Vysvětlením, kromě rozdílné exprese, může být i rozdílné působení jednotlivých receptorů. Například *in vitro* se u 12 KAA při aktivaci SSTR1 a SSTR2 prokázala inhibice sekrece α -podjednotky a chromograninu A. Oproti GH a GH/PRL secernujícím adenomům se nepotvrdil inhibiční efekt na sekreci cestou SSTR5. Ani při použití analog pro SSTR2/5 se neprokázal aditivní účinek, ale ani účinek antagonistický na sekreci. Při selektivním působení na SSTR5 však docházelo k inhibici buněčného růstu, stejně tak při působení analogy pro SSTR2/5. K zhoršení inhibice

buněčného růstu došlo při kombinaci s analogem pro SSTR1.¹⁷⁵ Je tedy zřejmé, že u akromegalie či hypertyreózy na podkladě TSH adenomu dosáhneme kontroly symptomů onemocnění snáze současnými analogy s ohledem na jejich rozdílný profil exprese somatostatinových receptorů. Oproti tomu KAA se klinickými symptomy z hypersekrece neprojevují a navíc mají rozdílný hormonální profil. Z výše uvedeného lze předpokládat, že rozložení jednotlivých typů somatostatinových receptorů může vysvětlovat, a před zahájením léčby i predikovat, lepší léčebnou odpověď a dosud biologicky neuspokojivě vysvětlený anti-neoplastický účinek současně používaných somatostatinových analog.

5 Cíle dizertační práce

Zavést a optimalizovat kvantitativní analýzu D2 dopaminového receptoru pomocí real-time RT-PCR u nemocných operovaných pro KAA do laboratorní praxe ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

Kvantitativně určit expresi D2 podtypu dopaminového receptoru ve velké sérii klinicky afunkčních adenomů.

Korelovat výsledky exprese D2 dopaminového receptoru s patologickou klasifikací adenomu dle imunohistochemického vyšetření.

5.1 Pracovní hypotézy

- 1) Dopaminový receptor nebude exprimován ve všech klinicky afunkčních adenomech.
- 2) Míra exprese D2 receptoru bude různá.
- 3) Exprese se bude lišit podle typu adenomu.

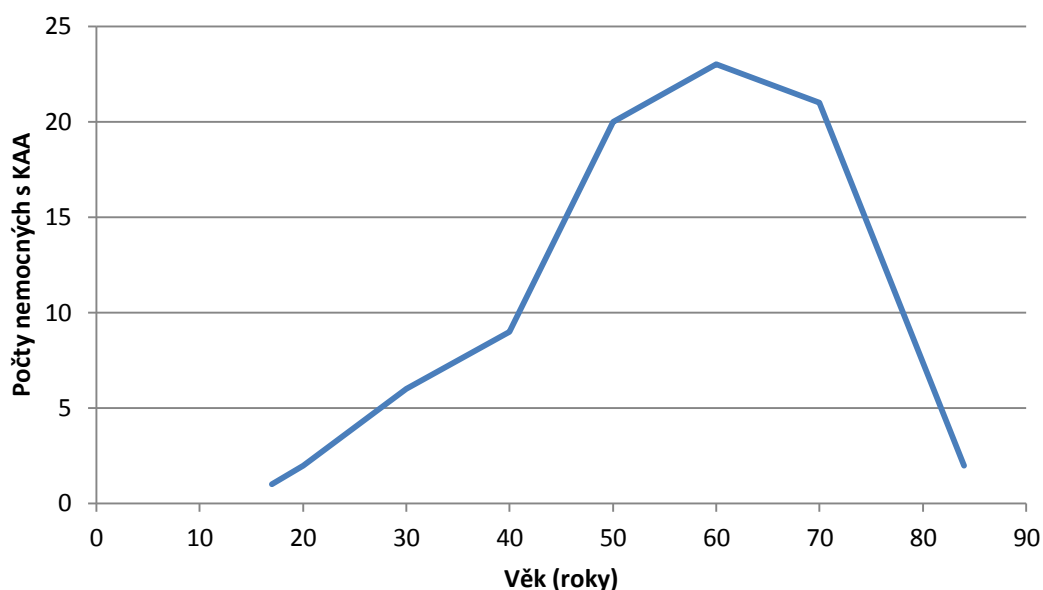
6 Použité metody a soubor nemocných

6.1 Pacienti

Diagnóza KAA byla založena na vyloučení hypersekrece pomocí laboratorních testů – hladina IGF-I byla v normálním rozmezí nebo nižší pro daný věk, hladina prolaktinu v séru byla normální nebo lehce nad normu s ohledem na kompresi stopky hypofýza patrnou na MRI. Volný močový kortizol nebyl zvýšen. Sérové volné tyreoidální hormony byly v normě nebo pod ní. Diagnóza adenomu byla potvrzena histologickým vyšetřením po operaci.

Do analýzy bylo zahrnuto celkem 87 pacientů s KAA. Pacienti byli operováni na předních neurochirurgických pracovištích v České republice. Šlo o nemocné operované na Neurochirurgické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Ústřední vojenské nemocnice Praha – Střešovice a nemocné z Neurochirurgické kliniky Lékařské fakulty univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Na pražském pracovišti operovala nemocné dvojice zkušených neurochirurgů – doc. MUDr. David Netuka, Ph.D. a major MUDr. Václav Masopust, v Hradci Králové pak dvojice neurochirurgů doc. MUDr. Jiří Náhlovský, CSc. a MUDr. Tomáš Česák, Ph.D. Všichni nemocní podepsali informovaný souhlas a celý výzkum byl schválen etickou komisí. Až na 3 nemocné podstoupili všichni pacienti operaci transsfenoidálním přístupem. Na pražském pracovišti byl používán operační přístup transsfenoidální cestou za pomoci endoskopu. 3 nemocní z hradeckého pracoviště podstoupili operaci adenomu subfrontálním přístupem pro recidivu a rozsah nálezu. Z celkového počtu pacientů s KAA bylo 55 mužů a 32 žen ve věku 17 až 84 let (průměr \pm standardní odchylka $59,4 \pm 14,3$, medián 62,5 roku). Rozdělení nemocných dle věku je znázorněno v grafu č. 2.

Graf 2 Rozdělení nemocných s KAA dle věku

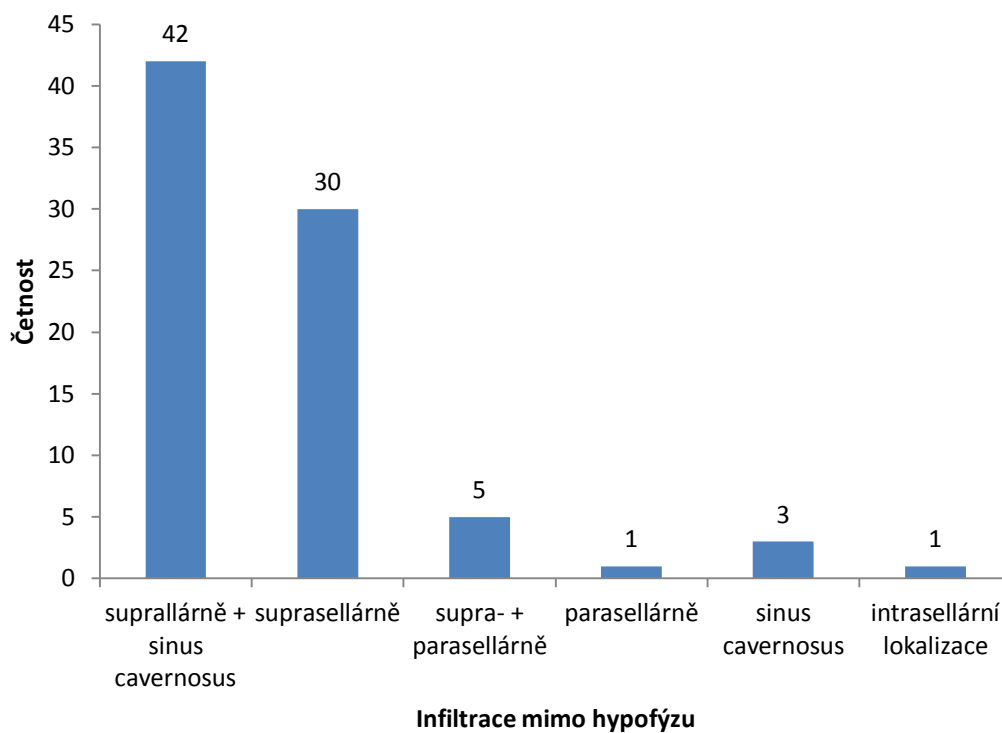


Na grafu č. 2 je patrné, že největší výskyt klinicky afunkčních adenomů s nutností operační intervence byl mezi 50 a 70 roky života.

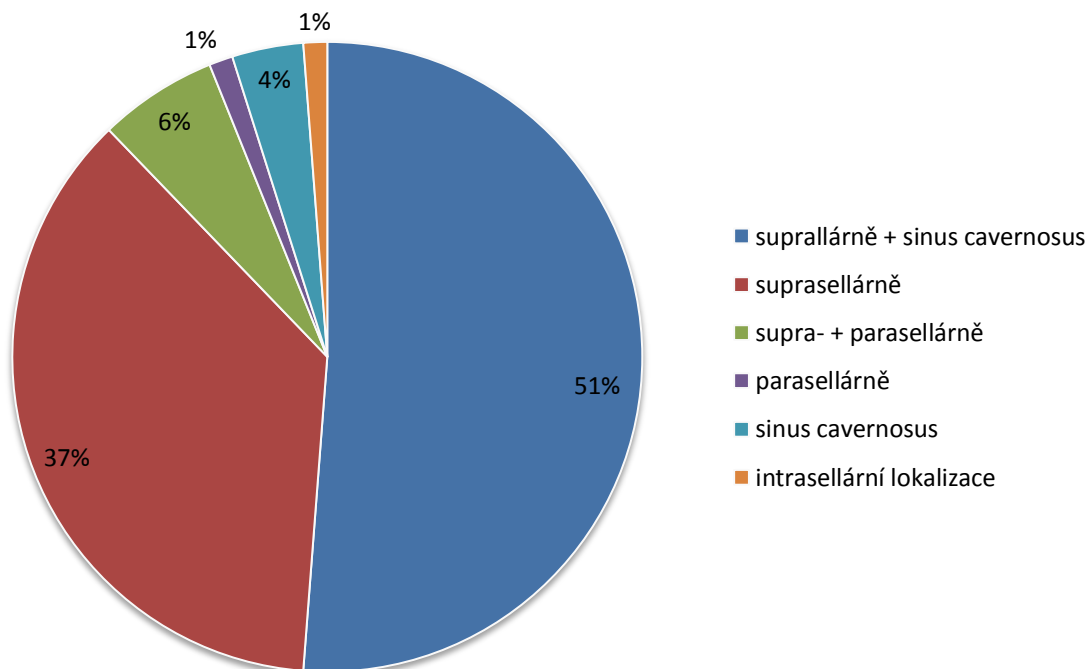
Všechny tumory byly makroadenomy v největším rozměru od 11 do 42 mm (průměr \pm standardní odchylka 24 ± 7 mm, medián 24 mm). Směr a lokalizace infiltrace jednotlivých KAA je znázorněna v grafu 3 a 4.

Hlavní indikací k operaci byla porucha zraku, bitemporální hemianopsie – 47 případů (54 %), diplopie s ohledem na nervovou obrnu – 16 případů (18 %), progresse nebo růst tumoru na MRI – 27 případů (31 %) a bolesti hlavy u 6 (7 %) nemocných. Panhypopituitarismus byl předoperačně prokázán u 25 (29 %) pacientů a vyžadoval substituci tyroxinem a hydrokortisonem. U 2 pacientů byl přítomen diabetes insipidus. Z celkového počtu 32 žen bylo 29 menopauzálních a tyto nebyly léčeny hormonální substitucí. 2 ze 3 premenopauzálních žen byly léčeny substitucí estrogeny pro projevy hypogonadismu. Hypogonadismus byl zjištěn také u 26 mužů z 55. U 14 z nich bylo přistoupeno k substituci testosteronem předoperačně.

Graf 3 Četnost KAA dle místa šíření mimo hypofýzu



Graf 4 Procentuální rozdělení KAA dle místa infiltrace



6.2 Histologie a imunohistochemie

Tkáň vyjmutá při operaci byla vyšetřována standardním způsobem popisovaným v literatuře.⁷⁹ Část tkáně odoperovaného adenomu byla bezprostředně fixována v 10 % formalínu, zpracována běžnou technikou a následně zafixována v parafínu. Řezy 5 μm tlusté byly obarveny hematoxylin-eozinem a Goldbergovým trichromem. Gömöriho stříbření bylo použito k obarvení vaziva. Další řezy byly použity k imunohistochemickému vyšetření. Tyto řezy byly exponovány v citrátovém pufru - pH 6,0 k vychytání antigenu v teplém prostředí za použití mikrovlnné trouby (700 W, 15 min). Vyšetřovali jsme tyto hormony: ACTH (C-terminálně specifická protilátka, klon 02A3, DAKO); GH; prolaktin a specifické β -podjednotky dimerických glykoproteinů TSH, FSH, LH, a jejich společnou α -podjednotku (monoklonální protilátka, IMMUNOTECH Praha). Dále byla použita avidin-biotin technika a diaminobenzidínové barvení. Expres jednotlivých hormonů byla hodnocena semikvantitativně ve 4 stupních: 0 – absolutně negativní, 1 – lehká pozitivita v méně než 15 % buněk, 2 – pozitivita v 15 – 70 % buněk a 3 – silná pozitivita ve více než 70 % buněk.

6.3 Kvantifikace mRNA

Ke kvantifikaci mRNA byla použita část tumorózní tkáně, do velikosti cca 5 mm, získaná během transsfenoidální operace. Tato tkáň byla po odběru vložena do RNAlateru (Quiagen) pro udržení stability RNA a zamražena dle protokolu výrobce a uchovávána při -80°C až do analýzy. Zbývající část resekovaného tumoru byla podrobena standardnímu histologickému a imunohistochemickému vyšetření. Po rozmražení tkáně byla tato homogenizována v MagnaLyseru v "MagnaLyser green Beads" (obojí Roche Diagnostics) a poté byla provedena izolace celkové RNA pomocí Trizolu (Invitrogen). Čistota a kvantita takto získané RNA byla měřena přímou spektrofotometrií pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 (Thermo-Scientific). Posléze byla provedena v dubletu reverzní transkripce (Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix, Invitrogen) koncentračně optimalizované RNA. Část získané cDNA byla uchována pro další analýzu a 5 μl bylo použito pro real-time PCR kvantifikaci (RotorGene 6000, Corbett) pomocí hydrolytických sond (TIB MolBiol). Reakční mix (25 μl) pro real-time PCR kvantifikaci obsahoval 12.5 μl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM každého primeru, 200 nM sonda a 5 μl cDNA. Pro reakci byly použity primery pro D2 receptor od firmy GeneriBiotech, CZ. Sekvence obou primerů a hydrolytické sondy (TIB MolBiol) jsou

v tabulce č.5. Sonda i primery byly již dříve publikovány¹⁷⁶ a obsahují nukleotidové sekvence krátké i dlouhé isoformy D2R. 50 cyklů PCR složených z 15s denaturace při 95 °C a 60s annealingu a elongace při 60 °C, bylo provedeno na přístroji Rotor-Gene 6000, Corbett. Všechna vyšetření byla provedena v dubletu. Standardní křivka pro kvantifikaci RNA D2R byla vytvořena postupným naředěním TOPO plasmidového vektoru obsahujícího zaklonovanou nukleotidovou sekvenci D2R (Generi Biotech). S ohledem na degradační procesy postihující nukleové kyseliny byla kvantita RNA následně normalizována vůči β glucoronidase (GUS) housekeepingovému genu (Ipsogene). Protokol celého postupu je uveden v příloze č. 1.

Tabulka 5 Sekvence primerů a sondy užitých pro kvantitativní real-time RT PCR

D2R forward	5'- CAA GAC CAT GAG CCG TAG GAA G-3'
D2R reverse	5'- TGT GTG TGA TGA AGA AGG GCA G-3'
Hydrolytická sonda	5-FAM-CCC AGC AGA AGG AGA AGA AAG CCA CTC A-TAMRA-3

Analýza somatostatinových receptorů byla provedena z již získané zamražené cDNA připravené pro analýzu D2R. Měření již nebyla prováděna v dubletu. Pro analýzu byly použity sekvence (Tab. č.6) publikované již v práci Taboady a spol.¹²⁰

Tabulka 6 Sekvence primerů pro SSTR2,3 a 5 včetně délky produktu a čísla v GenBank.

Typ receptoru	Forward	Reverse	Délka produktu (bp)	Číslo v genové bance
SSTR2	GGCATGTTTGACTTTGTGGTG	GTCTCATTCAGCCGGGATTT	185	NM001050
SSTR3	TGCCTTCTTTGGGCTCTACTT	ATCCTCCTCCTCAGTCTTCTCC	190	NM001051
SSTR5	CTGGTGTTTGCGGGATGTT	GAAGCTCTGGCGGAAGTTGT	183	NM001053

6.4 Statistická analýza

Kvantita mRNA pro D2R byla vyjádřena absolutně v kopiích na 5 μl cDNA a relativně, jako poměr počtu kopií D2R k počtu kopií housekeepingového genu GUS. Distribuce hodnot v celém souboru i v jednotlivých skupinách dle imunohistochemické klasifikace má negaussovské rozdělení při použití Kolmogorov-Smirnova testu (s Lillieforovou korekcí). Z tohoto důvodu byly skupiny charakterizovány mediány a percentily. Pro zhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Mann-Whitney rank sum test. Porovnání bylo provedeno i s použitím Kruskal-Wallisovy analýzy rozptylů (Dunnova metoda) se stejnými

výsledky. Použito bylo programu SigmaStat verze 3.5 (Systat Software, San Jose, California).

V případě krabičkového grafu (box chartu), představuje horní okraj krabičky 75. percentil, dolní okraj pak 25. percentil distribuce dat. Medián je zobrazen linií uprostřed krabičky. Kníry představují rozsah pro 99. percentil, malý čtverec zobrazuje aritmetický průměr a křížky extrémní hodnoty.

7 Výsledky

7.1 Imunohistochemická charakteristika

Patologická klasifikace nádorů je shrnuta v tabulce č. 7. Ve 4 případech byla imunohistologická klasifikace nejasná a nebyl dostatek materiálu pro její zopakování. Tyto adenomy byly vyřazeny z dalšího hodnocení. Ve většině případů adenomy exprimovaly alespoň lehkou pozitivitu pro glykoproteinové hormony LH, FSH a/nebo jejich podjednotku alfa. Mezi adenomy bylo 7 tichých kortikotropních adenomů a 7 plurihormonálních adenomů. Plurihormonální tumory exprimovaly LH, FSH a/nebo alfa-podjednotku ve všech případech navíc s ACTH, PRL a TSH v různých kombinacích. Tabulka č. 8

Tabulka 7 Rozdělení adenomů dle imunohistologické klasifikace

Typ adenomu	Počet	%
Nezařazen/nedostatek materiálu	4	
Null-cell	6	7,2
Gonadotropní	63	75,9
Tiché kortikotropy	7	8,4
Plurihormonální	7	8,4

Tabulka 8 Imunohistochemický profil plurihormonálních adenomů

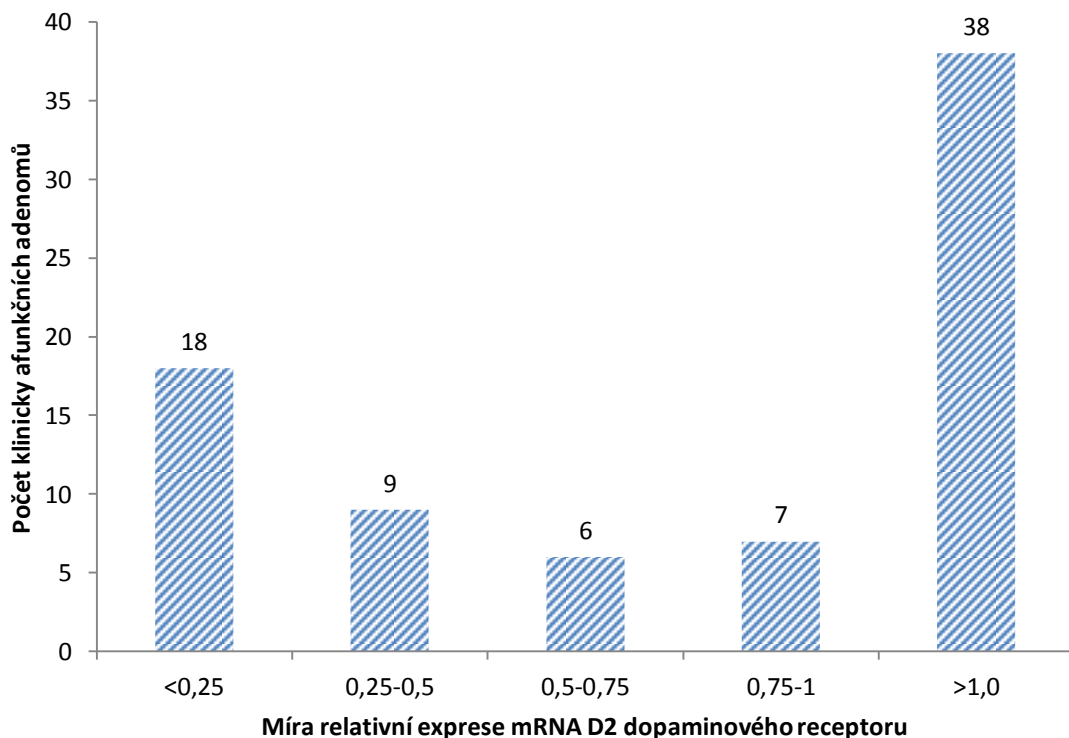
Číslo	Imunohistochemické vyšetření								
	histologie	ACTH	STH	PRL	α -podjednotka	LH	FSH	TSH	Ki-67 (%)
H303/09	+	-	+	++	+	+	+		1,0
5752/07	-	-	+	++	+	-	-		<0,5
1624/08	+	-	-	-	+	++	-		<0,5
7304/06	-	+++	++	++	-	-	++		<0,5
2700/08	-	-	+	+	+	+	+		<0,5
930/09	+	-	-	++	++	++	+		<0,5
H706/08	++	-	++	+	-	-	-		ND

7.2 Exprese mRNA dopaminového D2 receptoru

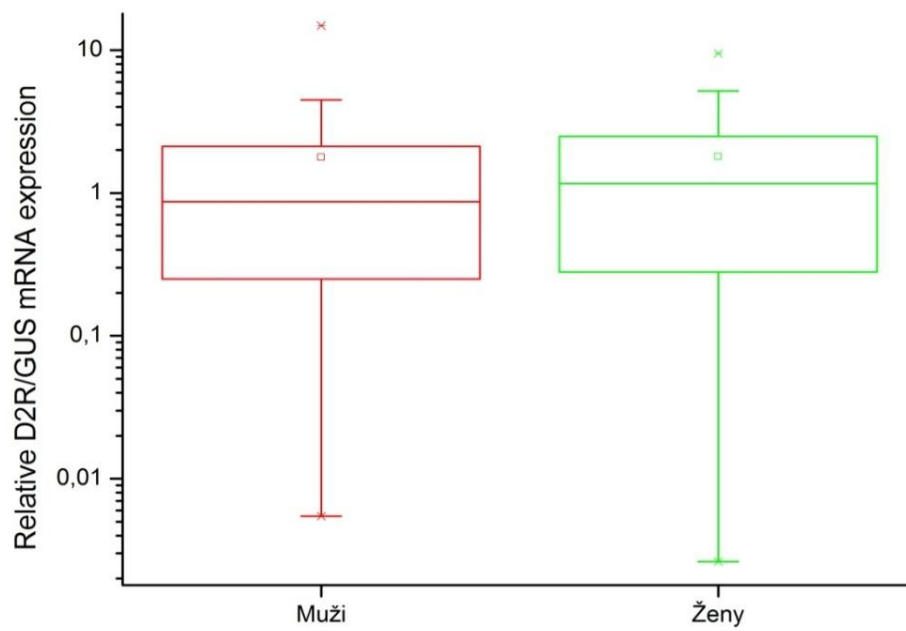
Jak již bylo zmíněno výše, pro nejasnou imunohistologickou klasifikaci byly vyloučeny 4 vzorky. Dalších 5 z 87 vzorků KAA exprimovalo méně než 100 kopií/5 μ l cDNA housekeepingového genu a pravděpodobnost, že tedy šlo o tkáň hypofýzy, byla malá, proto byly tyto vzorky z další analýzy vyřazeny. Všech 78 hodnocených KAA exprimovalo mRNA D2R. Byla přítomna vysoká variabilita míry exprese mRNA D2R (graf č. 5). Při rozdělení do skupin dle relativní míry exprese mRNA pro D2R vůči genu GUS 18 KAA vykázalo nízkou expresi. Ve 22 KAA se exprese pohybovala mezi 0,25 a 1,0. Ve 38 KAA byla míra exprese vysoká. Absolutní hodnota míry exprese mRNA D2R se pohybovala od 0,93 do 1 689 137 kopií/ 5 μ l cDNA. Relativně (po normalizaci na housekeepingový gen GUS) pak od 0,003 do 14,86. Variační koeficient odrážející nepřesnost měření v dubletu se pohyboval od 0,2 do 34 %.

Nebyl statisticky významný rozdíl v expresi mRNA D2R mezi pohlavími (Mann-Whitney, $P=0,374$, graf č. 6) ani při rozdělení nemocných dle věku (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P=0,757$, graf č. 7). Stejně tak nebyl statisticky významný rozdíl v expresi D2R s ohledem na místo šíření adenomu (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P=0,678$, graf č. 8).

Graf 5 Počty klinicky afunkčních adenomů rozdělené do skupin dle míry relativní exprese mRNA D2R vůči housekeepingovému genu GUS.

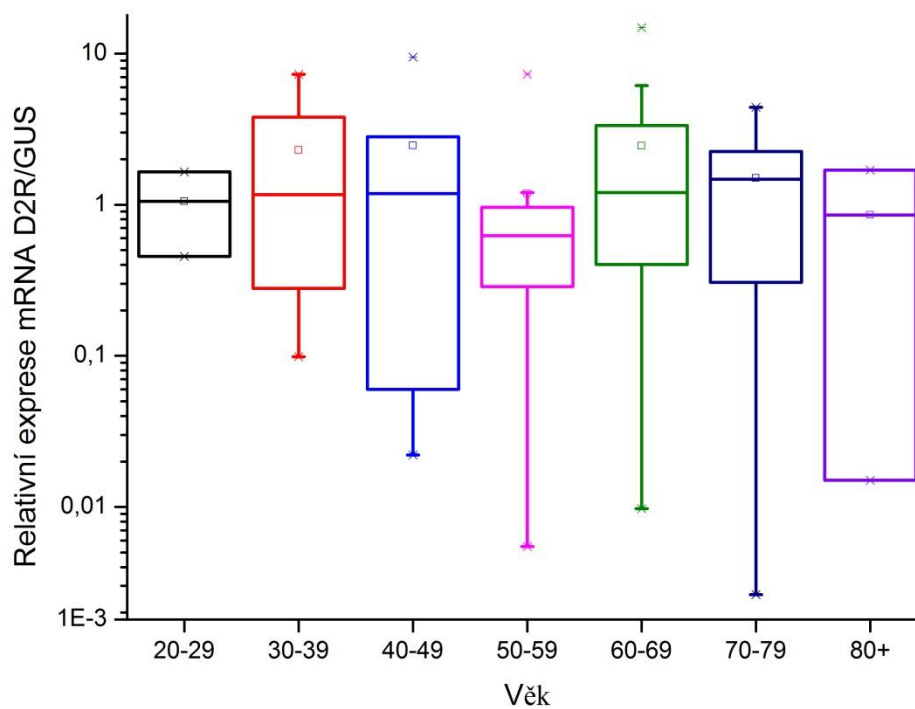


Graf 6 Relativní míra exprese mRNA D2R normalizovaná vůči GUS genu v klinicky afunkčních adenomech rozdělená dle pohlaví.



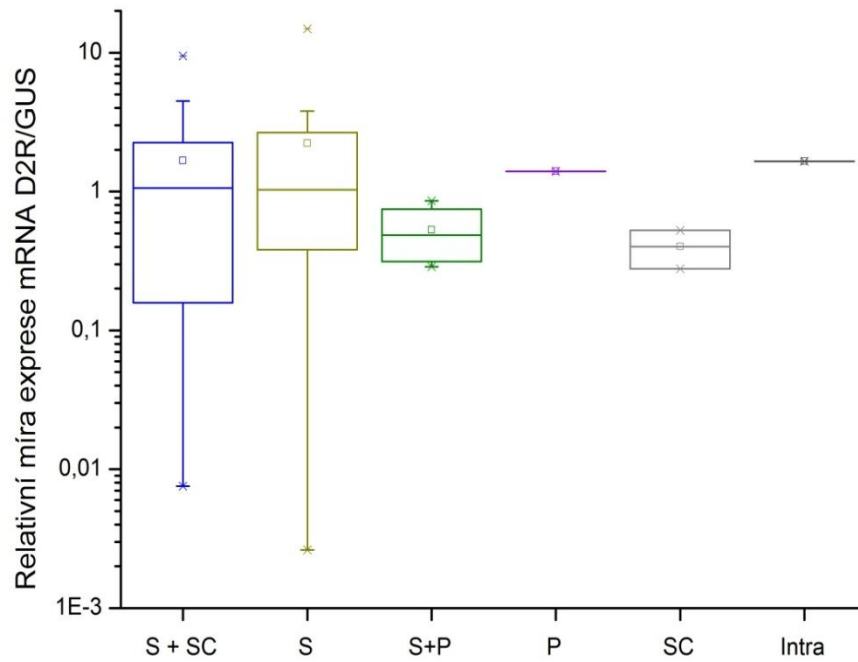
Nebyl patrný statisticky významný rozdíl v míře exprese mRNA dopaminového D2 receptoru mezi pohlavími.

Graf 7 Relativní míra exprese mRNA D2R normalizovaná vůči GUS genu v klinicky afunkčních adenomech rozdělená dle věku



Nebyl patrný statisticky významný rozdíl v míře exprese mRNA dopaminového D2 receptoru ve vztahu k věku nemocných operovaných pro klinicky afunkční adenom.

Graf 8 Relativní míra exprese mRNA D2R normalizovaná vůči housekeepingovému genu GUS v klinicky afunkčních adenomech rozdělená dle šíření růstu adenomu



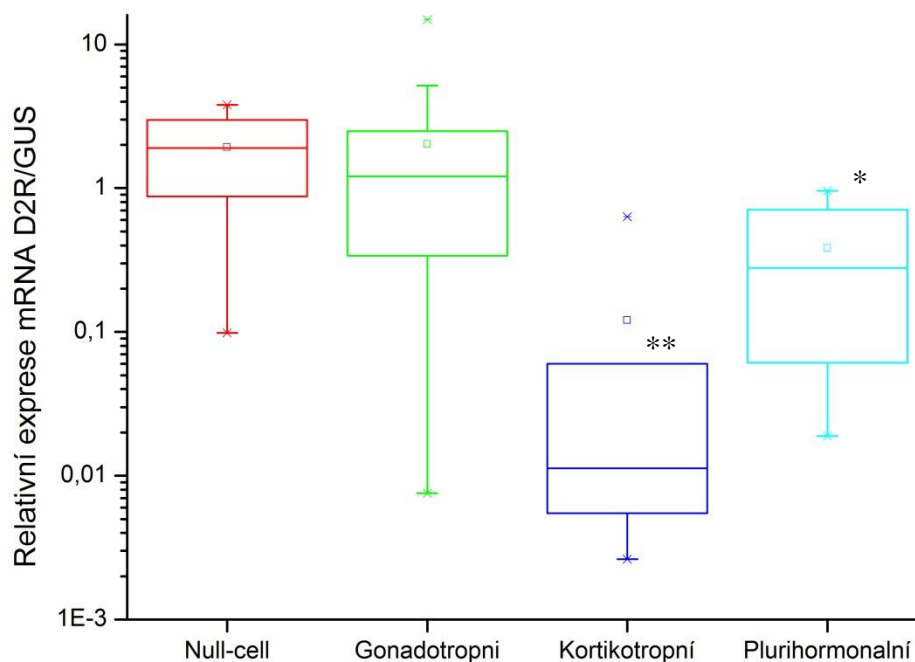
Nebyl patrný statisticky významný rozdíl v míře exprese mRNA dopaminového D2 receptoru ve vztahu k místu lokalizace a šíření adenomu.

S – supraselárně; SC – sinus cavernosus; P – paraselárně; Intra – Intraselárně

7.3 Vztah exprese D2R a patologické klasifikace KAA

Expres D2R byla velmi nízká u všech tichých kortikotropních adenomů (medián relativní exprese 0,01). V ostatních typech adenomů byl medián relativní exprese 0,4 u plurihormonálních adenomů, 1,3 u gonadotropinů a 1,9 u null-cell adenomů. Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy a ostatními typy KAA byl statisticky významný při použití Mann-Whitneyova testu ($p=0.003$). U plurihormonálních tumorů byla rovněž nalezena nižší exprese D2R než v null-cell a gonadotropních adenomech ($p=0.036$ při použití Mann-Whitneyova testu). Avšak po vyloučení adenomů s expresí ACTH nebyl pozorován žádný rozdíl vůči ostatním typům.

Graf 9 Relativní exprese mRNA normalizovaná vůči GUS v jednotlivých typech KAA rozdělených dle imunohistochemické pozitivity hormonů



Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy a ostatními typy byl statisticky významný ($p=0.003$). V plurihormonálních adenomech byla nižší exprese D2R než v null-cell a gonadotropních adenomech ($p=0.036$). Statisticky signifikantní rozdíl: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

7.4 Exprese mRNA somatostatinových receptorů podtyp SSTR2, SSTR3 a SSTR5

Všech 78 hodnocených KAA exprimovalo mRNA pro SSTR2 a SSTR3. Naopak SSTR5 nebyl přítomen ve 33 adenomech (42 %). Absolutní hodnota míry exprese mRNA SSTR2 byla v kvantitě 1174,8–146 680,8 kopií/5 μ l cDNA, SSTR3 62,9–46 914,3 a SSTR5 0–43 776,6 kopií/5 μ l cDNA. Relativně po normalizaci na housekeepingový gen GUS pak 0,05–105,69 pro SSTR2, 0,002–12,26 pro SSTR3 a 0,10–25,33 pro SSTR5. Byla rovněž přítomna vysoká variabilita míry exprese mRNA pro somatostatinový receptor 2 a 3 (graf č. 10). Nebyl statisticky významný rozdíl v expresi mRNA SSTR mezi pohlavími (Mann-Whitney, $P=0,837$; $P=273$ a $P=0,853$) ani při rozdělení nemocných dle věku (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P=0,870$, $P=0,250$ a $P=0,439$).

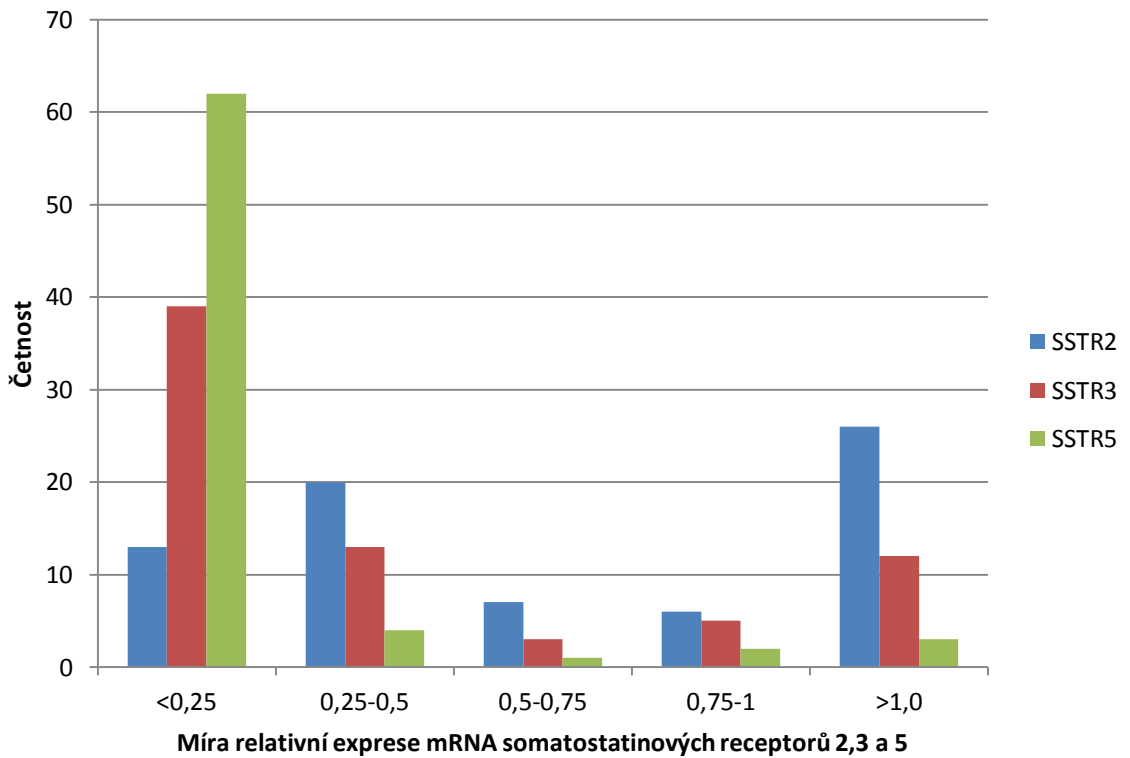
7.4.1 Exprese SSTR v jednotlivých typech KAA

Při hodnocení míry exprese u všech klinicky afunkčních adenomů bez rozdílu imunohistochemické positivity byla exprese SSTR2 signifikantně vyšší než SSTR3 a SSTR5. Stejně tak SSTR3 byl exprimován více než SSTR5 (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P<0,001$).

Exprese SSTR v jednotlivých typech klinicky afunkčních adenomů dle imunohistochemického profilu je znázorněna v grafech č. 12–14. Medián relativní exprese mRNA byl u null-cell adenomů 5,53 pro SSTR2, 0,5 pro SSTR3 a SSTR5 nebyl exprimován. Rozdíl v expresi mezi SSTR2, 3 a 5 nebyl signifikantní (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P=0,2$). U gonadotropních pak byl medián relativní exprese 0,49 pro SSTR2, 0,19 pro SSTR3 a 0,01 pro SSTR5. Rozdíl v míře exprese jednotlivých podtypů byl v rámci gonadotropních adenomů statisticky významný (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P<0,001$).

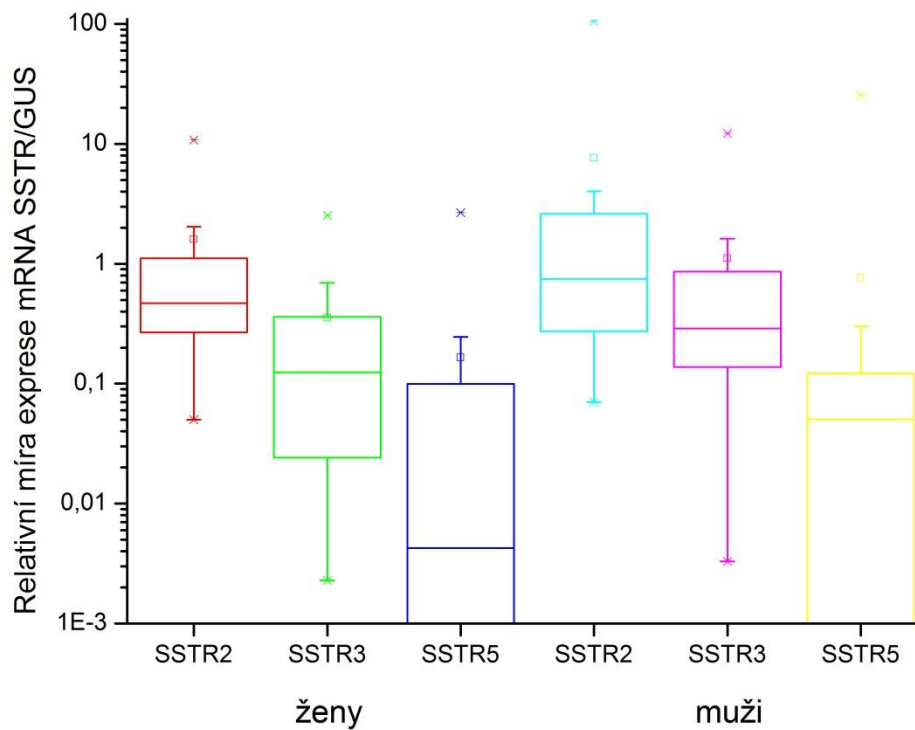
U tichých kortikotropních adenomů byl medián relativní míry exprese 0,65 pro SSTR2, 0,10 pro SSTR3 a 0,14 pro SSTR5. U plurihormonálních adenomů 1,7 pro SSTR2, 0,7 pro SSTR3 a 0,05 pro SSTR5. Míra exprese SSTR5 byla vyšší u tichých kortikotropních adenomů. Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy a ostatními typy KAA byl statisticky významný při použití Mann-Whitneyova testu ($p=0,044$). Nebyl nalezen rozdíl v expresi SSTR2 a SSTR3 s ohledem na jednotlivé imunohistochemické typy. Nebyla nalezena korelace exprese mRNA pro žádný z SSTR a D2R. Korelovala mezi sebou exprese SSTR2 a 3 (graf č. 15) – Pearsonova korelace, korelační koeficient 0,956, $P<0,05$.

Graf 10 Počty klinicky afunkčních adenomů rozdělené do skupin dle míry relativní exprese mRNA somatostatinových receptorů 2,3 a 5.



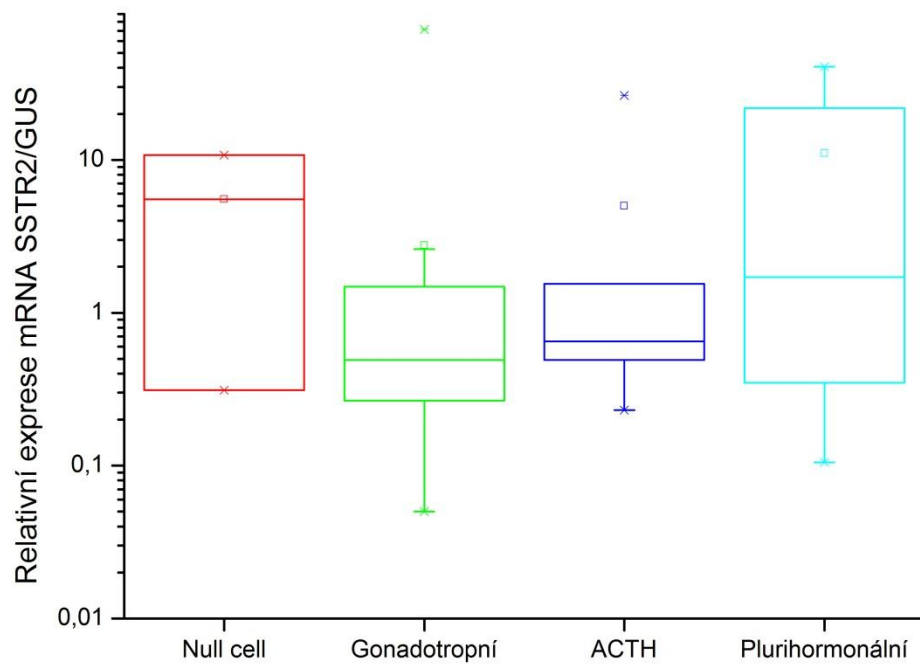
Při rozdělení adenomů dle míry exprese mRNA SSTR2, 3 a 5 je patrná velmi nízká exprese SSTR5. Exprese SSTR2 převyšovala nad SSTR3 a dosahovala vyšších hodnot.

Graf 11 Relativní exprese mRNA SSTR 2,3 a 5/GUS pro obě pohlaví.



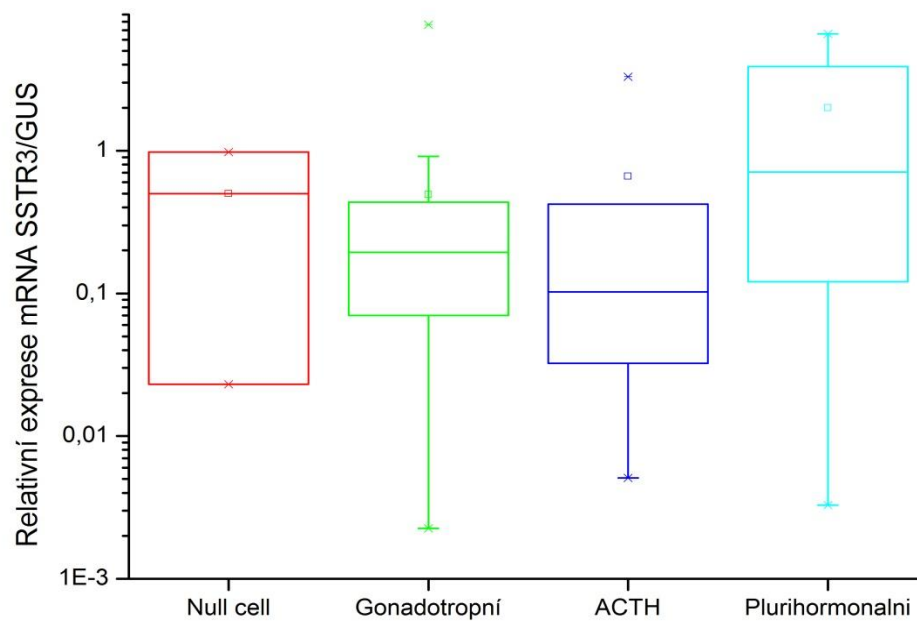
Nebyl patrný statisticky významný rozdíl v míře exprese mRNA somatostatinových receptorů SSTR2, 3 a 5 mezi pohlavími. (Mann-Whitney, $P=0,837$; $P=0,273$ a $P=0,853$).

Graf 12 Relativní exprese mRNA SSTR2 normalizovaná vůči GUS v jednotlivých typech KAA rozdělených dle imunohistochemické pozitivity hormonů



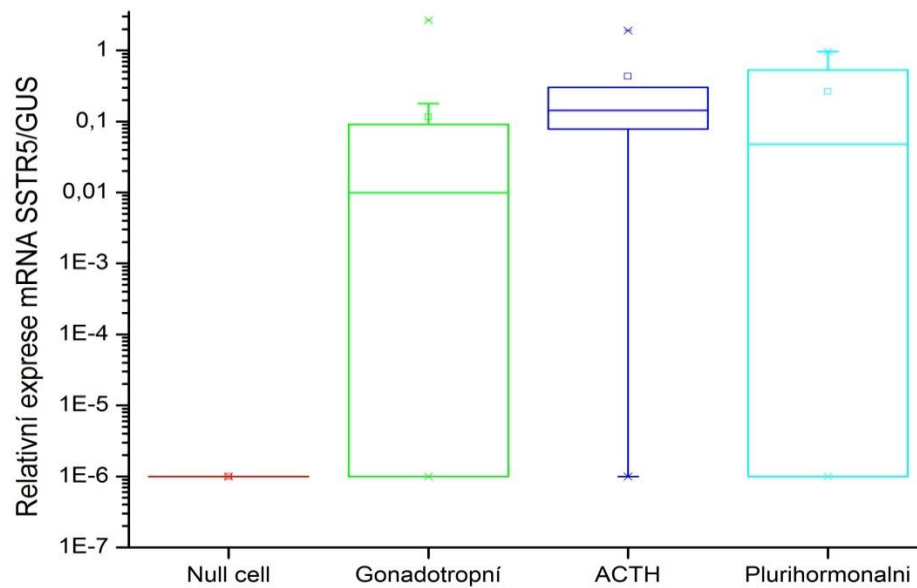
Při hodnocení míry exprese mRNA somatostatinového receptoru 2 nebyl mezi jednotlivými imunohistochemickými podtypy nalezen statisticky významný rozdíl.

Graf 13 Relativní exprese mRNA SSTR3 normalizovaná vůči GUS v jednotlivých typech KAA rozdělených dle imunohistochemické pozitivity hormonů



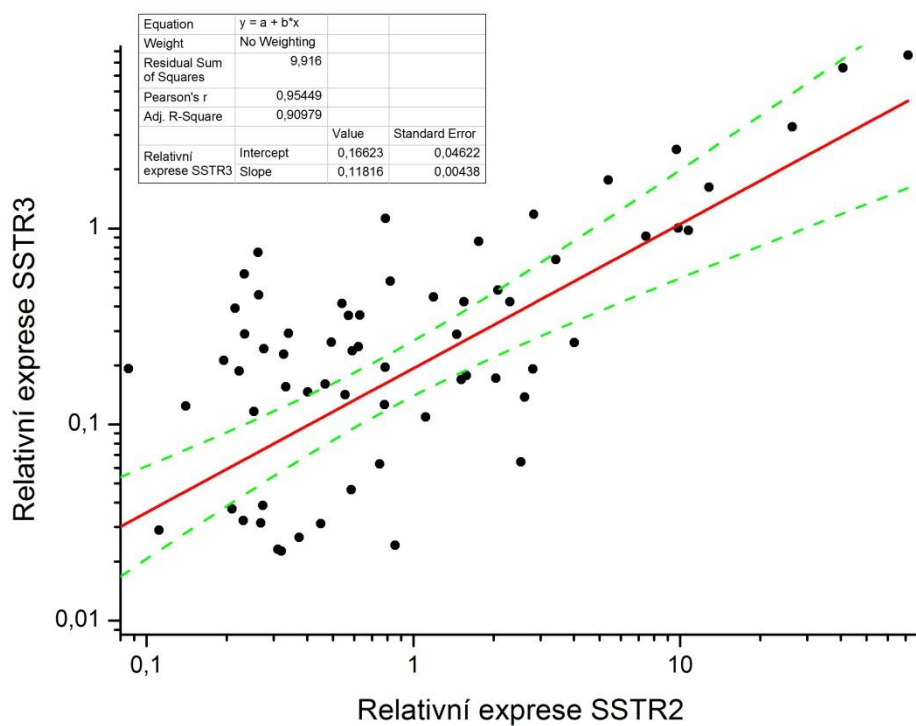
Při hodnocení míry exprese mRNA somatostatinového receptoru 3 nebyl mezi jednotlivými imunohistochemickými podtypy nalezen statisticky významný rozdíl.

Graf 14 Relativní exprese mRNA SSTR5 normalizovaná vůči GUS v jednotlivých typech KAA rozdělených dle imunohistochemické pozitivity hormonů



Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy v míře exprese SSTR5 a ostatními typy byl statisticky významný ($p=0.044$).

Graf 15 Korelace relativní exprese mRNA SSTR2 a 3.



Korelovala mezi sebou pouze exprese SSTR2 a 3 – Pearsonova korelace, korelační koeficient 0,956, $P < 0,05$.

7.5 Porovnání exprese D2R a SSTR 2, 3 a 5

Klinicky afunkční adenomy bez rozdílu dle imunohistochemie:

Při porovnání dopaminového D2 receptoru (medián relativní exprese 0,99) a SSTR2 (medián relativní exprese 0,55) ve všech adenomech, bez rozdílu imunohistochemie, nebyl nalezen signifikantní rozdíl v míře exprese (Mann-Whitney Rank Sum Test, $P=0,262$). Naopak byla nalezena signifikantně vyšší míra exprese mRNA pro D2R oproti SSTR3 (medián relativní exprese 0,19) a SSTR 5 (medián relativní exprese 0,02), (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P<0,001$).

Gonadotropní adenomy:

Při rozdělení dle imunohistochemického profilu byla exprese mRNA pro D2R u gonadotropních adenomů (medián relativní exprese 1,3) statisticky významně vyšší než SSTR2 (medián relativní exprese 0,49; Mann-Whitney Rank Sum Test, $P<0,01$), stejně tak pro SSTR3 (medián relativní exprese 0,19; Mann-Whitney Rank Sum Test, $P<0,001$) a SSTR5 (medián relativní exprese 0,01; Mann-Whitney Rank Sum Test, $P<0,001$). Viz. graf. č.16.

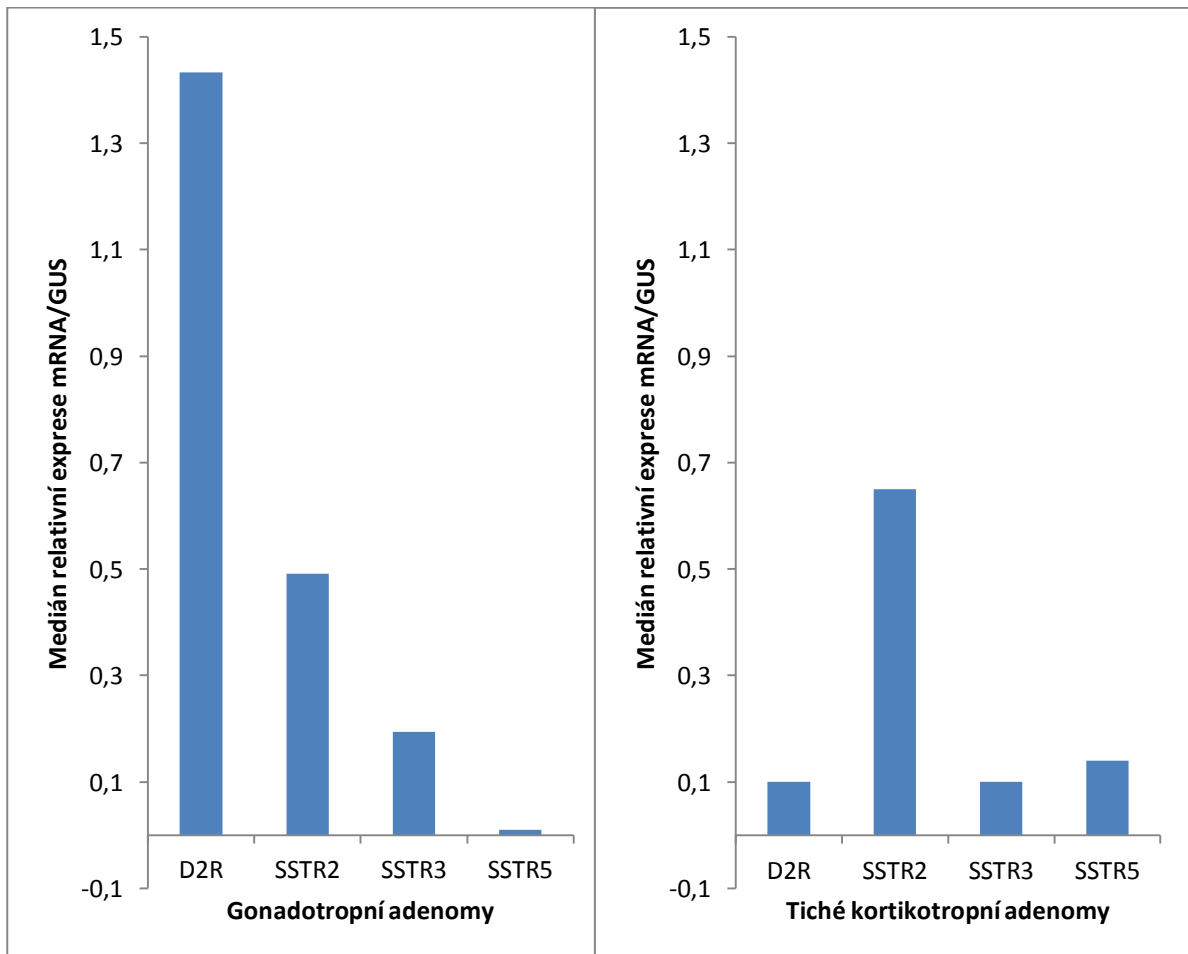
Tiché kortikotropní adenomy:

Míra exprese u kortikotropních adenomů byla signifikantně nižší pro D2R (medián relativní exprese 0,01) než pro SSTR2 (medián relativní exprese 0,65), (Mann-Whitney Rank Sum Test $P=0,015$). Statisticky významný rozdíl nebyl mezi expresí D2R a SSTR3 a 5 ($P=0,24$), ani SSTR2 a 5 ($P=0,65$). Viz. graf. č.16.

Adenomy bez imunohistochemické positivity a plurihormonální adenomy:

Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi mírou exprese D2R a SSTR 2, 3 a 5 v null-cell a plurihormonálních adenomech (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $P=0,112$ a $P=0,214$).

Graf 16 Expresse D2R a SSTR 2, 3 a 5 v gonadotropních a tichých kortikotropních adenomech



Vlevo je patrná signifikantně vyšší míra exprese mRNA D2R než somatostatinových receptorů. Stejně tak byly přítomny statisticky významné rozdíly mezi mírou exprese jednotlivých SSTR. Vpravo je znázorněna míra exprese v tichých kortikotropních adenomech, kde statisticky významný rozdíl byl mezi mírou exprese SSTR2 a D2R.

8 Diskuze

Přesto, že se klinicky afunkční adenomy neprojevují příznaky z hormonální nadprodukce, lze u nich produkci hormonů (jak již bylo zmíněno v definici) prokázat. Imunohistochemické vyšetření prokázalo pozitivitu pro gonadotropní hormony LH a FSH v 76 % vyšetřovaných adenomů. To je více, než byla frekvence výskytu gonadotropních adenomů nalezená ve velké sérii 3489 (z toho 2011 tichých a klinicky afunkčních) adenomů v německém registru.² Rozdíl by mohlo vysvětlit to, že v naší studii nebylo prováděno vyšetření elektronovým mikroskopem. Lehká glykoproteinová pozitivita v méně než 10 % buněk může být pozorována i u null-cell adenomů. Ve skutečnosti, většina onkocytomů a null-cell adenomů patří do skupiny gonadotropních adenomů, neboť exprimují steroidogenní faktor 1 a transkripční faktor, které jsou specifické pro gonadotropní linii.¹⁷⁷ Zastoupení tichých kortikotropních a plurihormonálních adenomů bylo ve shodě s prací Osamury.¹⁷⁸ Rovněž věk a pohlaví operovaných pacientů byly ve shodě s daty již publikovanými na větším souboru.¹⁴

Dopaminové receptory jsou kódovány 5 oddělenými geny pro dopaminový receptor 1 až 5. Podtyp 2 dopaminového receptoru existuje ve 2 variantách – dlouhé a krátké, které se tvoří alternativní sestřihem. Naše primery zachycují sekvenci shodnou pro dlouhou i krátkou izoformu D2R genu, jak je zmíněno výše v metodice. V normální lidské hypofýze je exprimován hlavně dopaminový receptor 2 a 5 s predominancí typu D2R. D3R není přítomen a exprese D1R a D4R je nízká.¹⁴⁸ Důvodem, proč jsme se zaměřili na expresi D2R v naší práci, je nejvyšší exprese mezi dopaminovými receptory v lidské hypofýze a jeho úloha v léčbě dopaminergními agonisty.

V normální hypofýze D2R zprostředkovává inhibici sekrece prolaktinu působením dopaminu.⁹⁷ Léky působící na D2R jsou pak u prolaktinomů schopny zmenšit jejich velikost a kontrolovat nadměrnou sekreci prolaktinu. Studie hodnotící přítomnost D2R pomocí *in-situ* hybridizace a scintigrafie prokázaly přítomnost míst vázících dopamin u KAA.^{105, 158} V posledních letech je pak více používána RT-PCR ke kvantifikaci exprese mRNA pro rozdílné typy dopaminových receptorů. Pivonello a kol. našel expresi D2R ve 12 z 18 hodnocených KAA (67 %) s predominancí dlouhé isoformy D2R.¹⁰² V naší práci jsme pozorovali expresi D2R ve všech hodnocených KAA. Ve shodě s našimi výsledky jsou i další nedávné práce,^{148, 179} včetně práce Su a kol.¹⁸⁰

Cílem naší práce bylo korelovat výsledky exprese mRNA D2R s jednotlivými typy adenomu dle imunohistopatologie založené na imunohistochemickém průkazu jednotlivých hypofyzárních hormonů. Renner a kol. publikoval v roce 1998 práci s KAA od 18 pacientů, kde téměř všechny gonadotropin-immunopozitivní adenomové buňky exprimovaly mRNA pro D2R. Šlo o práci hodnotící přítomnost D2R pomocí in situ hybridizace.¹⁴⁶ Očekávali jsme tedy vyšší expresi mRNA pro D2R u adenomů vysoce pozitivních na LH, FSH a jejich α -podjednotku. Ačkoli jde v současné době v našem případě o největší soubor nemocných publikovaný v literatuře (78 hodnocených KAA, 63 gonadotropinomů), nenalezli jsme žádný statisticky signifikantní vztah mezi kvantitativní expesí mRNA D2R a imunohistochemickou pozitivitou gonadotropních hormonů.

Velmi nízká exprese mRNA D2R byla u všech tichých kortikotropních adenomů. Tento výsledek potvrzuje výsledky své práce Tateno a kol.¹⁵⁹ Rovněž Su ve své práci na 51 KAA prokázal nižší expresi mRNA D2R u tichých kortikotropních adenomů, ta však nebyla statisticky významná.¹⁸⁰

Nobels a kol. poukázal na skupinu KAA s významnou hypersekrecí gonadotropinů nebo jejich podjednotky. Tato skupina by mohla lépe odpovídat na léčbu dopaminergními agonisty.¹⁰⁷ Konzervativní léčba KAA dopaminovými agonisty je však stále experimentální. Souhrnné práce ukazují kumulativní zmenšení tumoru ve 27,6 % a míru růstu rezidua v 8,5 %.⁹⁹ Dle některých autorů může být pooperační léčba prevencí růstu reziduálního tumoru. Ve své práci Greenman a kol. léčila pooperačně 33 KAA dopaminovými agonisty. U 11 reziduálních tumorů došlo ke zmenšení po léčbě. Bohužel tato studie nehodnotila expresi D2R.¹⁸¹ Efekt dopaminových agonistů závisí na kvantitě jejich exprese s tím, že krátká varianta je se svými vlastnostmi predispozicí pro lepší výsledek.¹⁰² Na podkladě výsledků naší práce lze říci, že přítomnost D2R může být předpokládána na základě imunohistopatologické klasifikace adenomů pouze u tichých kortikotropních adenomů. U nich byla exprese velmi nízká. Plurihormonální tumory, které bývají obvykle velké a agresivně rostoucí, měly rovněž statisticky významně nižší expresi. Většina KAA jsou však gonadotropinomy a null-cell adenomy. U nich nelze z exprese glykoproteinových hormonů predikovat míru exprese D2R a odpověď na léčbu. Současně velmi heterogenní míra exprese D2R může být vysvětlením pro rozporuplné výsledky dosavadních experimentů s léčbou dopaminovými agonisty. Stejně tak práce Su stanovující expresi mRNA D2R pomocí kvantitativní real-time RT-PCR prokázala o mnoho nižší míru exprese mRNA D2R u klinicky afunkčních adenomů oproti prolaktinomům. Stejně tak

byla exprese D2R 4krát nižší u rezistentních prolaktinomů oproti prolaktinomům s dobrou odpovědí na léčbu DA.¹⁸⁰

8.1 Limity kvantitativní analýzy

Limitací práce, stejně jako v našem případě, může být fakt, že byla měřena pouze exprese mRNA D2R. Na kortikotropních hypofyzárních adenomech však de Bruin prokázal, že exprese mRNA D2R velmi dobře korelovala s expresí D2R proteinu.¹⁸² Práce má však své další limity. Prvním zlomovým místem může být operační výkon. Záleží hodně na zkušenosti neurochirurga, aby odebraný, do 5 mm velký, vzorek tkáně pocházel opravdu z tumoru hypofýzy. S ohledem na popisovanou nestabilitu RNA v prostředí, nelze použít s jistotou parafínové bločky, kde by přítomnost tumoru byla potvrzena patologem. Tento nejistý krok lze v současné době eliminovat pouze relativní kvantifikací vztaženou na house-keepingový gen. Jde o gen, který je potřebný pro základní buněčné funkce, bývá přítomen v relativně konstantním množství a je svou specificitou vhodný pro danou tkáň. Vzorky s nedostatečnou expresí housekeepingového genu pak musí být vyloučeny pro možnost přítomnosti jiné tkáně než buněk hypofyzárního adenomu. Novou možností by pak bylo hodnocení pomocí *in-situ* hybridizace hodnotící přímo přítomnost RNA kvantitativně.¹⁸³ Oproti dosavadním *in-situ* hybridizačním metodám ale v současnosti má RT-PCR vyšší senzitivitu. Ta však může být přeceňována, zejména v případě somatostatinových receptorů. Ke kontaminaci reakce může dojít receptory exprimovanými v krevních cévách, imunitních buňkách, stromatu a okolních buňkách tumorózní tkáně, které rovněž exprimují somatostatinové receptory. Dobře známé limity samotné PCR reakce byly vzaty v úvahu již při přípravě (hledání vhodných primerů a sond) a optimalizaci celého postupu. S ohledem na vysokou senzitivitu samotné PCR může dojít ke kontaminaci netemplátovou nukleovou kyselinou z okolního prostředí. Práce v dobře zavedené laboratoři s bariérovými opatřeními je nutností, stejně tak jako pozitivní a negativní kontroly. Důležitá je taky optimální teplota a rychlost zpracování s ohledem na aktivitu všudypřítomných RNAáz.

8.2 Somatostatinové receptory

Nověji jsme rozšířili náš výzkum o somatostatinové receptory. SSTR jsou kódovány 5 oddělenými geny pro somatostatinový receptor 1–5.¹⁶⁵ Z toho SSTR2 má podtyp A a B a SSTR5 existuje u hypofyzárních adenomů v pozměněné formě, která obsahuje menší počet transmembránových domén (SSTR5-TMD4 a SSTR5-TMD5). Exprese SSTR1 a SSTR4 je

u KAA velmi nízká. Dominuje exprese SSTR2 a SSTR3.¹²⁰ Dalším z důvodu hodnocené exprese SSTR2,3 a 5 bylo, že v současné době jsou v klinické praxi dostupná analoga pro SSTR2 a SSTR5, užívaná hlavně v léčbě neuroendokrinních tumorů a akromegalie. Somatostatin svým působením na somatostatinové receptory reguluje v lidském těle mnoho endokrinních i exokrinních funkcí, ale i moduluje buněčnou diferenciaci a proliferaci.¹⁶⁴ Druh jeho účinku závisí i na typu receptoru a odlišné nitrobuněčné signalizaci. V normální hypofýze somatostatin snižuje sekreci GH a TSH. V regulaci sekrece růstového hormonu se uplatňují receptory typu 2 a 5.¹⁷³ Léčba dlouhodobě působícími analogy vede ke zmírnění projevů u 64–74 % případů.¹⁸⁴ Ukázalo se, že existují tři typy akromegalických adenomů. Nejméně v polovině případů je sekrece regulována především nebo výhradně receptorem typu 2. Tyto případy dobře reagují na dnes používaná analoga. Asi desetina nereaguje na inhibici somatostatinem vůbec a konečně zbylé adenomy reagují na terapii jen částečně.¹⁸⁵ V těchto případech bylo prokázáno, že sekrece růstového hormonu je regulována jak receptorem typu 2, tak receptorem typu 5 a stimulace obou receptorů má potenciační účinek.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Navíc je prokázána *in vitro* a *in vivo* korelace exprese SSTR2 a snížení hladin GH a IGF-I po léčbě somatostatinovými analogy imunohistochemicky i PCR.^{120, 169, 171, 188} Ke zmenšení adenomu u akromegalie dochází méně často – v průměru u 21 % nemocných léčených po operaci a u 52 % léčených primárně konzervativně. Většinou se adenom zmenší o méně než 50 % objemu. Příčina tohoto zmenšení není zcela jasná. Je jisté, že terapie somatostatinovým analogem snižuje proliferační aktivitu adenomu, nevede ale k indukci apoptózy.^{79, 187} Asi jedna třetina akromegaliků je na léčbu rezistentní. Rezistence je dána denzitou a různou expresí SSTR. V rezistentních GH produkujících adenomech byla pozorována nízká exprese SSTR2 a naopak dominovala exprese SSTR5.¹⁸⁹ Je tedy zřejmé, že rozložení receptorů, jejich míra exprese a rozdílný typ účinku mají nepochybný podíl na potenciačním účinku zvolené léčby.

U KAA hodnotil pomocí real-time RT-PCR expresi SSTR Taboada u 19 KAA a u 9 gonadotropních hormonů pak Saveanu. V obou případech byla nejvyšší exprese SSTR3 a v menší míře SSTR2. SSTR5 nebyl přítomen, nebo byla jeho exprese nízká.^{120, 190} Stejných výsledků dosáhl i Tateno u 15 KAA a Saveanu a kol u 58 KAA.^{159, 160} V naší práci byla exprese SSTR2 a SSTR3 přítomna u všech adenomů. V absolutní i relativní kvantifikaci dominovala na prvním místě exprese SSTR2 následovaná expresí mRNA pro SSTR3. Jak pro všechny KAA dohromady, tak pro jednotlivé podtypy dle

imunohistochemického profilu. Zde se naše výsledky liší od předchozích. Ve shodě je naopak nízká nebo nepřítomná exprese SSTR 5. Exprese SSTR3 a SSTR2 se v jednotlivých imunohistochemických profilech nelišila. U tichých kortikotropních adenomů však byla míra exprese SSTR5 signifikantně vyšší. Vysokou expresi SSTR5 lze nalézt u kortikotropních adenomů, kde dominuje SSTR5 a kde je naopak velmi nízká míra exprese SSTR2, jak na 30 kortikotropních adenomech prokázal pomocí real-time RT PCR de Bruin.¹⁸² Obdobných výsledků u 12 ACTH produkujících adenomů dosáhl i Tateno, který současně hodnotil expresi i u 8 tichých kortikotropních adenomů a 15 KAA.¹⁵⁹ Ve shodě s naší prací je míra exprese SSTR2 oproti SSTR5 u silentních kortikotropních adenomů vyšší. Exprese SSTR5 však, na rozdíl od našich dat, byla nižší než u ostatních KAA. Jedním z vysvětlení by mohla být při velmi heterogenní míře exprese u všech somatostatinových receptorů, především velikost vyšetřovaného souboru.

Užití somatostatinových analog k léčbě KAA shrnula ve své práci Colao.⁹⁹ K redukci tumorózní masy u KAA při použití octreotidu dochází pouze ve 12 %⁹⁹. Růst tumoru nelze zcela přesně hodnotit vzhledem k velmi krátké době sledování u publikovaných prací, ale docházelo k němu asi v 5 %. Lze předpokládat ovšem hodnotu vyšší. Octreotid je somatostatinové analogum s preferenční afinitou k SSTR2 a o řád nižší afinitou k SSTR5. Vzhledem k převaze SSTR3 v KAA je možné, že další analog pasireotid, s vazbou na SSTR1-3 a SSTR5, by mohl mít větší efekt. Jeho největší afinita je však k SSTR5, což při současných znalostech o somatostatinových receptorech a jejich expresi nedává moc velké naděje. Ne moc dobře také dopadlo klinické zkoušení pasireotidu u nemocných s Cushingovým syndromem, kdy pasireotid v monoterapii byl účinný jen u 5 ze 17 (29 %) nemocných.¹⁹¹

8.3 Koexprese somatostatinových a dopaminových receptorů

Koexpresi somatostatinových a dopaminových receptorů zatím hodnotilo málo autorů. U většiny GH produkujících adenomů byla prokázána koexprese D2R, SSTR2 a SSTR5. Současně byla větší exprese D2R oproti SSTR.^{148, 192} U prolaktinomů pak byla exprese mRNA D2R 42–84 násobně větší než SSTR.¹⁹³ Stejně tak u kortikotropních adenomů byla prokázána koexprese D2R a SSTR5 v 60 % a D2R a SSTR2 ve 30 % vyšetřovaných adenomů.¹⁸² Navíc exprese D2R byla vyšší u tichých kortikotropních adenomů v porovnání s kortikotropními adenomy.¹⁵⁹ U KAA byla rovněž prokázána koexprese D2R, SSTR3 a SSTR2, s mírou exprese klesající ve stejném pořadí. U 14 KAA hodnotil koexpresi Neto. Přestože byla přítomna korelace mezi D2R a SSTR2, dlouhou isoformou

D2R a SSTR2 i 5 v normální hypofýze, nenalezl Neto korelaci ani u somatotropních adenomů ani u KAA.¹⁴⁸ Ani my jsme v naší práci neprokázali korelaci D2R a SSTR. Saveanu uvádí nepublikovaná data od 58 KAA, v nichž rovněž dominovala exprese D2R (medián relativní exprese 3,7) oproti SSTR3 (1,2) a SSTR2 (0,3).¹⁶⁰ V buněčných kulturách izolovaných z 38 KAA pak hodnotil expresi D2R a SSTR Florio. Opět převažovala relativní exprese D2R (2,9) nad SSTR3 (0,6) a SSTR2 (0,3). Exprese byla velmi variabilní a některé buňky neexprimovaly vůbec.¹³¹ Naše data jsou jen částečně ve shodě s předchozími pracemi. Míra exprese byla ve všech případech velmi variabilní. Stejně tak exprese D2R dominovala nad expresí somatostatinových receptorů u pacientů s gonadotropními adenomy, které tvořili většinu z našeho souboru nemocných s KAA. Nicméně v naší práci byla odlišná míra exprese SSTR3, který byl exprimován méně než SSTR2. Bohužel ani jedna z prací nehodnotila expresi s ohledem na imunohistochemické charakteristiky jednotlivých KAA. Neboť v porovnání s gonadotropními adenomy v ostatních podtypech klesala exprese v pořadí SSTR2 >> D2R >> SSTR3 u null-cell adenomů, SSTR2 >> SSTR3 >> D2R >> SSTR5 u plurihormonálních a SSTR2 >> SSTR5 >> D2R a SSTR3. Počty ostatních podtypů mimo gonadotropní adenomy jsou však poměrně malé k vyvozování konečných závěrů. Parciálně odlišná data si vysvětlujeme jak typem adenomů vzatých do analýzy, malým počtem nemocných v práci (např. práce Neta) anebo použitím buněčných kultur místo tkáně adenomu.

V naší práci jsme prokázali velmi heterogenní expresi dopaminového D2 receptoru a somatostatinových receptorů 2 a 3. Současně se znalostí těchto dat se otevírají dveře testování nových chimérických molekul i u klinicky afunkčních adenomů. Dopastatiny BIM-23A387 nebo BIM-23A370, které jsou mířeny proti SSTR2 a D2R ukázaly, při samostatném použití, schopnost snížit sekreci GH a prolaktinu u hypofyzárních tumorů ve srovnání se současnými SSA a DA.^{192, 194} Dosavadní výsledky jsou rozebrány v kapitole 2.6.3 Medikamentózní léčba. Pro KAA je k dispozici zatím stále málo dat, relevantní klinická data nejsou. Klinická studie s dopastatinem BIM23A760 byla ukončena hlavně pro dopaminergní efekt a z něj plynoucí nežádoucí účinky. Dosavadní dopastatiny zaměřené především proti SSTR2,5 a D2R neinhibují buněčné linie o mnoho více než dopaminový agonisté samotní. Dosud však nebyla plně odhalena role SSTR3 receptoru, který je v KAA exprimován nejvíce. Dopastatiny cíleně ovlivňující i SSTR3, proto mohou přinést nové možnosti. V budoucnu bude jistě vhodné stanovení exprese všech podtypů, včetně jednotlivých variant. Léčba by pak měla být volena s ohledem na profil exprese

somatostatinových a dopaminových receptorů. Nezbytná bude korelace těchto dat s léčebnou odpovědí. U neuroendokrinních tumorů se například zabývali stanovením somatostatinových receptorů jako markerů pro predikci chování tumoru kolegové z Brna. Nepozorovali sice prediktivní význam exprese SSTR2 ani SSTR5, statisticky významný byl však čas do progresu a radiologická odpověď u nemocných s nízkou až nulovou hladinou exprese mRNA pro SSTR4. Způsob, jakým k tomu dochází, je nejasný. Slabý a kol. se domnívají, že možným mechanismem je heterodimerizace SSTR4 s SSTR2 anebo SSTR5 a s tím související blokáda účinku somatostatinových analog.¹⁹⁵

Standardním přístupem v léčbě KAA tak v současné době je transsfenoidální adenektomie, nicméně pooperační přístup k nemocnému s reziduálním tumorem zůstává předmětem diskuzí. Dosud nejsou žádné evidence-based indikace jak pro „watch and wait“ tak pro radioterapii Lekselovým gamanožem či medikamentózní léčbu.¹⁹⁶ Naše práce je jedním z důkazů podporujících nutnost dalších prospektivních kontrolovaných studií zaměřených na zhodnocení léčby současnými i nově vyvíjenými agonisty ve vztahu k expresi jednotlivých typů receptorů.

9 Doporučení pro praxi

- Profil exprese somatostatinových a dopaminových receptorů by stejně jako imunohistologické vyšetření měl být standardní metodou pro všechny operované klinicky afunkční adenomy.
- Stále nejsou známy markery pro predikci dalšího biologického chování klinicky afunkčních adenomů a možnost předpovědět další chování a vybrat vhodnou léčbu. Identifikace těchto markerů by měla být nadále předmětem výzkumu.
- Je potřeba prospektivních randomizovaných kontrolovaných studií s použitím DA, SSA či chimérických molekul k prevenci a léčbě pooperačních reziduí.

10 Závěry

Klinicky afunkční adenomy tvoří nezanedbatelnou jednu třetinu všech pituitárních adenomů. Standardním přístupem v léčbě KAA zůstává transsfenoidální adenektomie, nicméně pooperační přístup k nemocnému s reziduálním tumorem zůstává předmětem diskuzí. Jednou z možností je i medikamentózní léčba dopaminovými anebo somatostatinovými analogy či nově jejich chimérickými molekulami. K jejich působení je potřeba příslušných receptorů na povrchu buněk adenomů.

V naší práci jsme celkem u 78 nemocných provedli zhodnocení kvantitativní míry exprese mRNA pro dopaminový receptor 2 s korelací dle jednotlivých imunohistopatologických charakteristik klinicky afunkčních adenomů. Míra exprese byla velmi variabilní. Signifikantně byla exprese dopaminového D2 receptoru velmi nízká v silentních kortikotropních adenomech a signifikantně nižší v plurihormonálních tumorech. Imunohistochemická pozitivita gonadotropinů nepředpovídá kvantitu D2R. Současně jsme vyhodnotili somatostatinový receptor 2, 3 a 5. SSTR5 je v silentních kortikotropních adenomech exprimován více, naopak exprese SSTR2 a 3 se dle histologického typu neliší. Nebyla nalezena korelace mezi expresí žádného ze somatostatinových receptorů 2, 3 a 5 s dopaminovým D2 receptorem. Korelovala mezi sebou exprese SSTR2 a 3. Současně jsme prokázali koexpresi D2R a somatostatinových receptorů u KAA s predominantní expresí D2R nad SSTR2 a 3 u gonadotropních adenomů.

Velmi heterogenní exprese dopaminových i somatostatinových receptorů může být důvodem proč experimentální použití analog těchto receptorů event. dopaminů není klinicky efektivní u většiny klinicky afunkčních adenomů. Je však potřeba dalších prospektivních, kontrolovaných studií s korelací léčebné odpovědi a exprese receptorů.

11 Literatura

1. GREENMAN, Y. & STERN, N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009 **23** 625-638.
2. SAEGER, W., LUDECKE, D. K., BUCHFELDER, M., FAHLBUSCH, R., QUABBE, H. J. & PETERSENN, S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol* 2007 **156** 203-216.
3. KATZNELSON, L., ALEXANDER, J. M. & KLIBANSKI, A. Clinical review 45: Clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 **76** 1089-1094.
4. DAVIS, J. R., FARRELL, W. E. & CLAYTON, R. N. Pituitary tumours. *Reproduction* 2001 **121** 363-371.
5. DALY, A. F., RIXHON, M., ADAM, C., DEMPEGIOTI, A., TICHOMIROWA, M. A. & BECKERS, A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 **91** 4769-4775.
6. MUHR, C., BERGSTROM, K., GRIMELIUS, L. & LARSSON, S. G. A parallel study of the roentgen anatomy of the sella turcica and the histopathology of the pituitary gland in 205 autopsy specimens. *Neuroradiology* 1981 **21** 55-65.
7. BURROW, G. N., WORTZMAN, G., REWCASTLE, N. B., HOLGATE, R. C. & KOVACS, K. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. *N Engl J Med* 1981 **304** 156-158.
8. EZZAT, S., ASA, S. L., COULDWELL, W. T., BARR, C. E., DODGE, W. E., VANCE, M. L. & MCCUTCHEON, I. E. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004 **101** 613-619.
9. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2004-2007. Central Brain Tumor Registry of the United States. 2011.
10. HALL, W. A., LUCIANO, M. G., DOPPMAN, J. L., PATRONAS, N. J. & OLDFIELD, E. H. Pituitary magnetic resonance imaging in normal human volunteers: occult adenomas in the general population. *Ann Intern Med* 1994 **120** 817-820.
11. CHONG, B. W., KUCHARCZYK, W., SINGER, W. & GEORGE, S. Pituitary gland MR: a comparative study of healthy volunteers and patients with microadenomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994 **15** 675-679.
12. MAREK, J. Incidentalomy v endokrinologii - hypofýza. *Interní Med.* 2001 **8** 358-362.
13. FERRANTE, E., FERRARONI, M., CASTRIGNANO, T., MENICATTI, L., ANAGNI, M., REIMONDO, G., DEL MONTE, P., BERNASCONI, D., LOLI, P., FAUSTINI-FUSTINI, M., BORRETTA, G., TERZOLO, M., LOSA, M., MORABITO, A., SPADA, A., BECK-PECCOZ, P. & LANIA, A. G. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol* 2006 **155** 823-829.
14. MINDERMAN, T. & WILSON, C. B. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994 **41** 359-364.
15. ALEXANDER, J. M., BILLER, B. M., BIKKAL, H., ZERVAS, N. T., ARNOLD, A. & KLIBANSKI, A. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* 1990 **86** 336-340.

16. LEVY, A., HALL, L., YEUDALL, W. A. & LIGHTMAN, S. L. p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994 **41** 809-814.
17. SPADA, A., LANIA, A. & MANTOVANI, G. Hormonal signaling and pituitary adenomas. *Neuroendocrinology* 2007 **85** 101-109.
18. ASA, S. L. & EZZAT, S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 1998 **19** 798-827.
19. TORDJMAN, K., STERN, N., OUAKNINE, G., YOSSIPHOV, Y., RAZON, N., NORDENSKJOLD, M. & FRIEDMAN, E. Activating mutations of the Gs alpha-gene in nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 **77** 765-769.
20. TABOADA, G. F., TABEL, A. L., NAVES, L. A., DE CARVALHO, D. P. & GADELHA, M. R. Prevalence of gsp oncogene in somatotropinomas and clinically non-functioning pituitary adenomas: our experience. *Pituitary* 2009 **12** 165-169.
21. SPADA, A., LANIA, A. & BALLARE, E. G protein abnormalities in pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol* 1998 **142** 1-14.
22. LANIA, A., MANTOVANI, G. & SPADA, A. Genetics of pituitary tumors: Focus on G-protein mutations. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003 **228** 1004-1017.
23. SALEHI, F., KOVACS, K., SCHEITHAUER, B. W., LLOYD, R. V. & CUSIMANO, M. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer* 2008 **15** 721-743.
24. CHESNOKOVA, V., ZONIS, S., KOVACS, K., BEN-SHLOMO, A., WAWROWSKY, K., BANNYKH, S. & MELMED, S. p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 **105** 17498-17503.
25. JIN, L., QIAN, X., KULIG, E., SANNO, N., SCHEITHAUER, B. W., KOVACS, K., YOUNG, W. F., JR. & LLOYD, R. V. Transforming growth factor-beta, transforming growth factor-beta receptor II, and p27Kip1 expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries. *Am J Pathol* 1997 **151** 509-519.
26. SANO, T., ASA, S. L. & KOVACS, K. Growth hormone-releasing hormone-producing tumors: clinical, biochemical, and morphological manifestations. *Endocr Rev* 1988 **9** 357-373.
27. XU, B., SANO, T., YAMADA, S., LI, C. C. & HIROKAWA, M. Expression of corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human pituitary corticotroph adenomas associated with proliferative potential. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 1220-1225.
28. GROSSMAN, A. B. The molecular biology of pituitary tumors: a personal perspective. *Pituitary* 2009 **12** 265-270.
29. LERICHE, V. K., ASA, S. L. & EZZAT, S. Epidermal growth factor and its receptor (EGF-R) in human pituitary adenomas: EGF-R correlates with tumor aggressiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 **81** 656-662.
30. MCANDREW, J., PATERSON, A. J., ASA, S. L., MCCARTHY, K. J. & KUDLOW, J. E. Targeting of transforming growth factor-alpha expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology* 1995 **136** 4479-4488.
31. WESSELS, H. T., HOFLAND, L. J., VAN DER WAL, R., VAN GASTEL, L., VAN KOETSVELD, P. M., DE HERDER, W. W. & DE JONG, F. H. In vitro secretion of FSH by cultured clinically nonfunctioning and gonadotroph pituitary adenomas is directly correlated with locally produced levels of activin A. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001 **54** 485-492.
32. DEKKERS, O. M., PEREIRA, A. M. & ROMIJN, J. A. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** 3717-3726.

33. ARAFAH, B. M., PRUNTY, D., YBARRA, J., HLAVIN, M. L. & SELMAN, W. R. The dominant role of increased intrasellar pressure in the pathogenesis of hypopituitarism, hyperprolactinemia, and headaches in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 1789-1793.
34. YOUNG, W. F., JR., SCHEITHAUER, B. W., KOVACS, K. T., HORVATH, E., DAVIS, D. H. & RANDALL, R. V. Gonadotroph adenoma of the pituitary gland: a clinicopathologic analysis of 100 cases. *Mayo Clin Proc* 1996 **71** 649-656.
35. COOPER, O., GELLER, J. L. & MELMED, S. Ovarian hyperstimulation syndrome caused by an FSH-secreting pituitary adenoma. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008 **4** 234-238.
36. HESELTINE, D., WHITE, M. C., KENDALL-TAYLOR, P., DE KRETZER, D. M. & KELLY, W. Testicular enlargement and elevated serum inhibin concentrations occur in patients with pituitary macroadenomas secreting follicle stimulating hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989 **31** 411-423.
37. MELMED, S. & KLEINBERG, D. Pituitary Masses and Tumors. In *Williams textbook of endocrinology*, edn 12th, ch. 9, pp 229-290. Ed S Melmed. United States of America: Elsevier Saunders, 2011.
38. FAMINI, P., MAYA, M. M. & MELMED, S. Pituitary magnetic resonance imaging for sellar and parasellar masses: ten-year experience in 2598 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 **96** 1633-1641.
39. VALASSI, E., BILLER, B. M., KLIBANSKI, A. & SWEARINGEN, B. Clinical features of nonpituitary sellar lesions in a large surgical series. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010 **73** 798-807.
40. TABARIN, A., LAURENT, F., CATARGI, B., OLIVIER-PUEL, F., LESCENE, R., BERGE, J., GALLI, F. S., DROUILLARD, J., ROGER, P. & GUERIN, J. Comparative evaluation of conventional and dynamic magnetic resonance imaging of the pituitary gland for the diagnosis of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998 **49** 293-300.
41. HAGIWARA, A., INOUE, Y., WAKASA, K., HABA, T., TASHIRO, T. & MIYAMOTO, T. Comparison of growth hormone-producing and non-growth hormone-producing pituitary adenomas: imaging characteristics and pathologic correlation. *Radiology* 2003 **228** 533-538.
42. BONNEVILLE, J. F., CATTIN, F. & BONNEVILLE, F. [Imaging of pituitary adenomas]. *Presse Med* 2009 **38** 84-91.
43. BERGSTROM, M., MUHR, C., LUNDBERG, P. O. & LANGSTROM, B. PET as a tool in the clinical evaluation of pituitary adenomas. *J Nucl Med* 1991 **32** 610-615.
44. ALZHRANI, A. S., FARHAT, R., AL-ARIFI, A., AL-KAHTANI, N., KANAAN, I. & ABOUZIED, M. The diagnostic value of fused positron emission tomography/computed tomography in the localization of adrenocorticotropin-secreting pituitary adenoma in Cushing's disease. *Pituitary* 2009 **12** 309-314.
45. DE SOUZA, B., BRUNETTI, A., FULHAM, M. J., BROOKS, R. A., DEMICHELE, D., COOK, P., NIEMAN, L., DOPPMAN, J. L., OLDFIELD, E. H. & DI CHIRO, G. Pituitary microadenomas: a PET study. *Radiology* 1990 **177** 39-44.
46. JEONG, S. Y., LEE, S. W., LEE, H. J., KANG, S., SEO, J. H., CHUN, K. A., CHO, I. H., WON, K. S., ZEON, S. K., AHN, B. C. & LEE, J. Incidental pituitary uptake on whole-body 18F-FDG PET/CT: a multicentre study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010 **37** 2334-2343.
47. VAN DEN BERGH, A. C., PRUIJ, J., LINKS, T. P., VAN DER VLIET, A. M., SLUITER, W., WOLFFENBUTTEL, B. H., LANGENDIJK, J. A., HOVING, E. W. & DULLAART, R. P. Tyrosine positron emission tomography and protein synthesis rate in pituitary

- adenoma: different effects of surgery and radiation therapy. *Radiother Oncol* 2011 **98** 213-216.
48. MAREK, J. Hyperprolactinemia in practice. *Interní Med.* 2008 **10** 549-554.
 49. JAFFE, C. A. Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary* 2006 **9** 317-321.
 50. NOBELS, F. R., KWEKKEBOOM, D. J., COOPMANS, W., HOEKSTRA, R., DE HERDER, W. W., BOUILLON, R. & LAMBERTS, S. W. A comparison between the diagnostic value of gonadotropins, alpha-subunit, and chromogranin-A and their response to thyrotropin-releasing hormone in clinically nonfunctioning, alpha-subunit-secreting, and gonadotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 **77** 784-789.
 51. YOSHINO, A., KATAYAMA, Y., WATANABE, T., OGINO, A., OHTA, T., KOMINE, C., YOKOYAMA, T., FUKUSHIMA, T. & HIROTA, H. Apoplexy accompanying pituitary adenoma as a complication of preoperative anterior pituitary function tests. *Acta Neurochir (Wien)* 2007 **149** 557-565; discussion 565.
 52. STÁRKA, LUBOSLAV & ZAMRAZIL, VÁCLAV. *Základy klinické endokrinologie*. 2005.
 53. ČÁP, JAN. Akutní stavy při onemocnění hypofýzy a hypothalamu. In *Akutní stavy v endokrinologii a diabetologii*, ch. 2, pp 27-36. Eds V Zamrazil & T Pelikánová. Praha: Galén, 2007.
 54. KARAVITAKI, N., COLLISON, K., HALLIDAY, J., BYRNE, J. V., PRICE, P., CUDLIP, S. & WASS, J. A. What is the natural history of nonoperated nonfunctioning pituitary adenomas? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007 **67** 938-943.
 55. MOLITCH, M. E. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008 **37** 151-171, xi.
 56. FELDKAMP, J., SANTEN, R., HARMS, E., AULICH, A., MODDER, U. & SCHERBAUM, W. A. Incidentally discovered pituitary lesions: high frequency of macroadenomas and hormone-secreting adenomas - results of a prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999 **51** 109-113.
 57. HONEGGER, J., ZIMMERMANN, S., PSARAS, T., PETRICK, M., MITTELBRONN, M., ERNEMANN, U., REINCKE, M. & DIETZ, K. Growth modelling of non-functioning pituitary adenomas in patients referred for surgery. *Eur J Endocrinol* 2008 **158** 287-294.
 58. REINCKE, M., ALLOLIO, B., SAEGER, W., MENZEL, J. & WINKELMANN, W. The 'incidentaloma' of the pituitary gland. Is neurosurgery required? *JAMA* 1990 **263** 2772-2776.
 59. DONOVAN, L. E. & CORENBLUM, B. The natural history of the pituitary incidentaloma. *Arch Intern Med* 1995 **155** 181-183.
 60. NISHIZAWA, S., OHTA, S., YOKOYAMA, T. & UEMURA, K. Therapeutic strategy for incidentally found pituitary tumors ("pituitary incidentalomas"). *Neurosurgery* 1998 **43** 1344-1348; discussion 1348-1350.
 61. FAINSTEIN DAY, P., GUITELMAN, M., ARTESE, R., FISZLEDJER, L., CHERVIN, A., VITALE, N. M., STALLDECKER, G., DE MIGUEL, V., CORNALO, D., ALFIERI, A. & MALLEA GIL, M. S. Retrospective multicentric study of pituitary incidentalomas. *Pituitary* 2004 **7** 145-148.
 62. ARITA, K., TOMINAGA, A., SUGIYAMA, K., EGUCHI, K., IIDA, K., SUMIDA, M., MIGITA, K. & KURISU, K. Natural course of incidentally found nonfunctioning pituitary adenoma, with special reference to pituitary apoplexy during follow-up examination. *J Neurosurg* 2006 **104** 884-891.

63. DEKKERS, O. M., HAMMER, S., DE KEIZER, R. J., ROELFSEMA, F., SCHUTTE, P. J., SMIT, J. W., ROMIJN, J. A. & PEREIRA, A. M. The natural course of non-functioning pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 2007 **156** 217-224.
64. LINDHOLM, J. A century of pituitary surgery: Schloffer's legacy. *Neurosurgery* 2007 **61** 865-867; discussion 867-868.
65. MAREK, J. Incidentalomy v endokrinologii - hypofýza. *Interní Med.* 2001 **2001** **8** 358-362.
66. NETUKA, D., MASOPUST, V., BELSAN, T., KRAMAR, F. & BENES, V. One year experience with 3.0 T intraoperative MRI in pituitary surgery. *Acta Neurochir Suppl* 2011 **109** 157-159.
67. CESAK, T., NAHLOVSKY, J., HOSSZU, T., REHAK, S., LATR, I., NEMECEK, S., CAP, J., RYSKA, P., SUBA, P. & CERMAN, J. Longitudinal Monitoring of the Growth of Post-Operation Non-Functioning Pituitary Adenomas. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* 2009 **72** 115-124.
68. LOSA, M., MORTINI, P., BARZAGHI, R., RIBOTTO, P., TERRENI, M. R., MARZOLI, S. B., PIERALLI, S. & GIOVANELLI, M. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenoma and analysis of the risk of tumor recurrence. *J Neurosurg* 2008 **108** 525-532.
69. CARON, P. [Clinically non functioning pituitary adenomas and gonadotroph-cell adenomas]. *Presse Med* 2009 **38** 103-106.
70. NOMIKOS, P., LADAR, C., FAHLBUSCH, R. & BUCHFELDER, M. Impact of primary surgery on pituitary function in patients with non-functioning pituitary adenomas -- a study on 721 patients. *Acta Neurochir (Wien)* 2004 **146** 27-35.
71. ALAMEDA, C., LUCAS, T., PINEDA, E., BRITO, M., URIA, J. G., MAGALLON, R., ESTRADA, J. & BARCELO, B. Experience in management of 51 non-functioning pituitary adenomas: indications for post-operative radiotherapy. *J Endocrinol Invest* 2005 **28** 18-22.
72. DEKKERS, O. M., PEREIRA, A. M., ROELFSEMA, F., VOORMOLEN, J. H., NEELIS, K. J., SCHROIJEN, M. A., SMIT, J. W. & ROMIJN, J. A. Observation alone after transsphenoidal surgery for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 **91** 1796-1801.
73. STEINER, E., KNOSP, E., HEROLD, C. J., KRAMER, J., STIGLBAUER, R., STANISZEWSKI, K. & IMHOF, H. Pituitary adenomas: findings of postoperative MR imaging. *Radiology* 1992 **185** 521-527.
74. CHANSON, P. & SALENAVE, S. Diagnosis and treatment of pituitary adenomas. *Minerva Endocrinol* 2004 **29** 241-275.
75. PARK, P., CHANDLER, W. F., BARKAN, A. L., ORREGO, J. J., COWAN, J. A., GRIFFITH, K. A. & TSIEN, C. The role of radiation therapy after surgical resection of nonfunctional pituitary macroadenomas. *Neurosurgery* 2004 **55** 100-106; discussion 106-107.
76. GREENMAN, Y., OUAKNINE, G., VESHCHEV, I., REIDER, GROSWASSER, II, SEGEV, Y. & STERN, N. Postoperative surveillance of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: markers of tumour quiescence and regrowth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003 **58** 763-769.
77. BROCHIER, S., GALLAND, F., KUJAS, M., PARKER, F., GAILLARD, S., RAFTOPOULOS, C., YOUNG, J., ALEXOPOULOU, O., MAITER, D. & CHANSON, P. Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients. *Eur J Endocrinol* 2010 **163** 193-200.

78. NOH, T. W., JEONG, H. J., LEE, M. K., KIM, T. S., KIM, S. H. & LEE, E. J. Predicting recurrence of nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 4406-4413.
79. CAP, J., CERMÁN, J., NEMEČEK, S., MAREKOVÁ, M., HANA, V. & FRYŠÁK, Z. The influence of treatment with somatostatin analogues on morphology, proliferative and apoptotic activity in GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Neurosci* 2003 **10** 444-448.
80. HONEGGER, J., PRETTIN, C., FEUERHAKE, F., PETRICK, M., SCHULTE-MONTING, J. & REINCKE, M. Expression of Ki-67 antigen in nonfunctioning pituitary adenomas: correlation with growth velocity and invasiveness. *J Neurosurg* 2003 **99** 674-679.
81. ABE, T., SANNO, N., OSAMURA, Y. R. & MATSUMOTO, K. Proliferative potential in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody MIB-1. *Acta Neurochir (Wien)* 1997 **139** 613-618.
82. LOSA, M., FRANZIN, A., MANGILI, F., TERRENI, M. R., BARZAGHI, R., VEGLIA, F., MORTINI, P. & GIOVANELLI, M. Proliferation index of nonfunctioning pituitary adenomas: correlations with clinical characteristics and long-term follow-up results. *Neurosurgery* 2000 **47** 1313-1318; discussion 1318-1319.
83. YONEZAWA, K., TAMAKI, N. & KOKUNAI, T. Clinical features and growth fractions of pituitary adenomas. *Surg Neurol* 1997 **48** 494-500.
84. KRISTOF, R. A., ROTHER, M., NEULOH, G. & KLINGMULLER, D. Incidence, clinical manifestations, and course of water and electrolyte metabolism disturbances following transsphenoidal pituitary adenoma surgery: a prospective observational study. *J Neurosurg* 2009.
85. BIERMASZ, N. R., DULKEN, H. V. & ROELFSEMA, F. Postoperative radiotherapy in acromegaly is effective in reducing GH concentration to safe levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000 **53** 321-327.
86. BIERMASZ, N. R., VAN DULKEN, H. & ROELFSEMA, F. Long-term follow-up results of postoperative radiotherapy in 36 patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 2476-2482.
87. MAREK, J., JEZKOVÁ, J., HANA, V., KRSEK, M., BANDUROVÁ, L., PECEN, L., VLADYKA, V. & LISČÁK, R. Is it possible to avoid hypopituitarism after irradiation of pituitary adenomas by the Leksell gamma knife? *Eur J Endocrinol* 2011 **164** 169-178.
88. SNEAD, F. E., AMDUR, R. J., MORRIS, C. G. & MENDENHALL, W. M. Long-term outcomes of radiotherapy for pituitary adenomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008 **71** 994-998.
89. ORUCKAPTAN, H. H., SENMEVSİM, O., OZCAN, O. E. & OZGEN, T. Pituitary adenomas: results of 684 surgically treated patients and review of the literature. *Surg Neurol* 2000 **53** 211-219.
90. MINNITI, G., TRAISH, D., ASHLEY, S., GONSALVES, A. & BRADA, M. Risk of second brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma: update after an additional 10 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 800-804.
91. PÁEK, S. H., DOWNES, M. B., BEDNARZ, G., KEANE, W. M., WERNER-WASIK, M., CURRAN, W. J., JR. & ANDREWS, D. W. Integration of surgery with fractionated stereotactic radiotherapy for treatment of nonfunctioning pituitary macroadenomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005 **61** 795-808.

92. JEZKOVA, J., MAREK, J., HANA, V., KRSEK, M., WEISS, V., VLADYKA, V., LISAK, R., VYMAZAL, J. & PECEN, L. Gamma knife radiosurgery for acromegaly--long-term experience. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 **64** 588-595.
93. LOEFFLER, J. S. & SHIH, H. A. Radiation therapy in the management of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 **96** 1992-2003.
94. BREEN, P., FLICKINGER, J. C., KONDIOLKA, D. & MARTINEZ, A. J. Radiotherapy for nonfunctional pituitary adenoma: analysis of long-term tumor control. *J Neurosurg* 1998 **89** 933-938.
95. PIVONELLO, R., FERONE, D., LOMBARDI, G., COLAO, A., LAMBERTS, S. W. & HOFLAND, L. J. Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 2007 **156 Suppl 1** S13-21.
96. BEN-JONATHAN, N. & HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001 **22** 724-763.
97. LAMBERTS, S. W. & MACLEOD, R. M. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 1990 **70** 279-318.
98. GILLAM, M. P., MOLITCH, M. E., LOMBARDI, G. & COLAO, A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev* 2006 **27** 485-534.
99. COLAO, A., DI SOMMA, C., PIVONELLO, R., FAGGIANO, A., LOMBARDI, G. & SAVASTANO, S. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2008 **15** 905-915.
100. MOLITCH, M. E. Pituitary tumors: cabergoline versus bromocriptine: a meta-analysis? *Nat Rev Endocrinol* 2011 **7** 254-255.
101. DOS SANTOS NUNES, V., EL DIB, R., BOGUSZEWSKI, C. L. & NOGUEIRA, C. R. Cabergoline versus bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemia: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *Pituitary* 2011 **14** 259-265.
102. PIVONELLO, R., MATRONE, C., FILIPPELLA, M., CAVALLO, L. M., DI SOMMA, C., CAPPABIANCA, P., COLAO, A., ANNUNZIATO, L. & LOMBARDI, G. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 1674-1683.
103. DE HERDER, W. W., REIJS, A. E., KWEKKEBOOM, D. J., HOFLAND, L. J., NOBELS, F. R., OEI, H. Y., KRENNING, E. P. & LAMBERTS, S. W. In vivo imaging of pituitary tumours using a radiolabelled dopamine D2 receptor radioligand. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996 **45** 755-767.
104. DE HERDER, W. W., REIJS, A. E., DE SWART, J., KAANDORP, Y., LAMBERTS, S. W., KRENNING, E. P. & KWEKKEBOOM, D. J. Comparison of iodine-123 epidepride and iodine-123 IBZM for dopamine D2 receptor imaging in clinically non-functioning pituitary macroadenomas and macroprolactinomas. *Eur J Nucl Med* 1999 **26** 46-50.
105. FERONE, D., LASTORIA, S., COLAO, A., VARRELLA, P., CERBONE, G., ACAMPA, W., MEROLA, B., SALVATORE, M. & LOMBARDI, G. Correlation of scintigraphic results using 123I-methoxybenzamide with hormone levels and tumor size response to quinagolide in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 248-252.
106. GREENMAN, Y. Dopaminergic treatment of nonfunctioning pituitary adenomas. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007 **3** 554-555.
107. NOBELS, F. R., DE HERDER, W. W., VAN DEN BRINK, W. M., KWEKKEBOOM, D. J., HOFLAND, L. J., ZUYDERWIJK, J., DE JONG, F. H. & LAMBERTS, S. W. Long-term

- treatment with the dopamine agonist quinagolide of patients with clinically non-functioning pituitary adenoma. *Eur J Endocrinol* 2000 **143** 615-621.
108. SCHADE, R., ANDERSOHN, F., SUISSA, S., HAVERKAMP, W. & GARBE, E. Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Engl J Med* 2007 **356** 29-38.
 109. ZANETTINI, R., ANTONINI, A., GATTO, G., GENTILE, R., TESEI, S. & PEZZOLI, G. Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2007 **356** 39-46.
 110. LANCELLOTTI, P., LIVADARIU, E., MARKOV, M., DALY, A. F., BURLACU, M. C., BETEA, D., PIERARD, L. & BECKERS, A. Cabergoline and the risk of valvular lesions in endocrine disease. *Eur J Endocrinol* 2008 **159** 1-5.
 111. BOGAZZI, F., BURALLI, S., MANETTI, L., RAFFAELLI, V., CIGNI, T., LOMBARDI, M., BORES, F., TADDEI, S., SALVETTI, A. & MARTINO, E. Treatment with low doses of cabergoline is not associated with increased prevalence of cardiac valve regurgitation in patients with hyperprolactinaemia. *Int J Clin Pract* 2008 **62** 1864-1869.
 112. KARS, M., DELGADO, V., HOLMAN, E. R., FEELDERS, R. A., SMIT, J. W., ROMIJN, J. A., BAX, J. J. & PEREIRA, A. M. Aortic valve calcification and mild tricuspid regurgitation but no clinical heart disease after 8 years of dopamine agonist therapy for prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** 3348-3356.
 113. VALLETTE, S., SERRI, K., RIVERA, J., SANTAGATA, P., DELORME, S., GARFIELD, N., KAHTANI, N., BEAUREGARD, H., ARIS-JILWAN, N., HOUDE, G. & SERRI, O. Long-term cabergoline therapy is not associated with valvular heart disease in patients with prolactinomas. *Pituitary* 2008.
 114. WAKIL, A., RIGBY, A. S., CLARK, A. L., KALLVIKBACKA-BENNETT, A. & ATKIN, S. L. Low dose cabergoline for hyperprolactinaemia is not associated with clinically significant valvular heart disease. *Eur J Endocrinol* 2008 **159** R11-14.
 115. COLAO, A., GALDERISI, M., DI SARNO, A., PARDO, M., GACCIONE, M., D'ANDREA, M., GUERRA, E., PIVONELLO, R., LERRO, G. & LOMBARDI, G. Increased prevalence of tricuspid regurgitation in patients with prolactinomas chronically treated with cabergoline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** 3777-3784.
 116. KARS, M., PEREIRA, A. M., BAX, J. J. & ROMIJN, J. A. Cabergoline and cardiac valve disease in prolactinoma patients: additional studies during long-term treatment are required. *Eur J Endocrinol* 2008 **159** 363-367.
 117. LOW, MJ. Neuroendocrinology. In *Williams textbook of endocrinology*, edn 12th, ch. 7, pp 103-174. Ed S Melmed. United States of America: Elsevier Saunders, 2011.
 118. HOFLAND, L. J. & LAMBERTS, S. W. Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann Oncol* 2001 **12 Suppl 2** S31-36.
 119. HOFLAND, L. J. & LAMBERTS, S. W. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev* 2003 **24** 28-47.
 120. TABOADA, G. F., LUQUE, R. M., BASTOS, W., GUIMARAES, R. F., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., FONTES, R., MATA, P. J., FILHO, P. N., CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D. & GADELHA, M. R. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007 **156** 65-74.
 121. LAMBERTS, S. J., DE HERDER, W., VAN DER LELY, A. J. & HOFLAND, J. Imaging and medical management of clinically nonfunctioning pituitary tumours. *Endocrinologist* 1995 448-451.

122. ZATELLI, M. C., PICCIN, D., VIGNALI, C., TAGLIATI, F., AMBROSIO, M. R., BONDANELLI, M., CIMINO, V., BIANCHI, A., SCHMID, H. A., SCANARINI, M., PONTECORVI, A., DE MARINIS, L., MAIRA, G. & DEGLI UBERTI, E. C. Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Endocr Relat Cancer* 2007 **14** 91-102.
123. HOFLAND, L. J. & LAMBERTS, S. W. Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy. *Front Horm Res* 2004 **32** 235-252.
124. WYMENGA, A. N., ERIKSSON, B., SALMELA, P. I., JACOBSEN, M. B., VAN CUTSEM, E. J., FIASSE, R. H., VALIMAKI, M. J., RENSTRUP, J., DE VRIES, E. G. & OBERG, K. E. Efficacy and safety of prolonged-release lanreotide in patients with gastrointestinal neuroendocrine tumors and hormone-related symptoms. *J Clin Oncol* 1999 **17** 1111.
125. RUSZNIEWSKI, P., DUCREUX, M., CHAYVIALLE, J. A., BLUMBERG, J., CLOAREC, D., MICHEL, H., RAYMOND, J. M., DUPAS, J. L., GOUEROU, H., JIAN, R., GENESTIN, E., BERNADES, P. & ROUGIER, P. Treatment of the carcinoid syndrome with the longacting somatostatin analogue lanreotide: a prospective study in 39 patients. *Gut* 1996 **39** 279-283.
126. DURAN-PRADO, M., MALAGON, M. M., GRACIA-NAVARRO, F. & CASTANO, J. P. Dimerization of G protein-coupled receptors: new avenues for somatostatin receptor signalling, control and functioning. *Mol Cell Endocrinol* 2008 **286** 63-68.
127. ROCHEVILLE, M., LANGE, D. C., KUMAR, U., PATEL, S. C., PATEL, R. C. & PATEL, Y. C. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 2000 **288** 154-157.
128. COLAO, A., FILIPPELLA, M., PIVONELLO, R., DI SOMMA, C., FAGGIANO, A. & LOMBARDI, G. Combined therapy of somatostatin analogues and dopamine agonists in the treatment of pituitary tumours. *Eur J Endocrinol* 2007 **156 Suppl 1** S57-63.
129. ANDERSEN, M., BJERRE, P., SCHRODER, H. D., EDAL, A., HOILUND-CARLSEN, P. F., PEDERSEN, P. H. & HAGEN, C. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001 **54** 23-30.
130. GRUSZKA, A., KUNERT-RADEK, J., RADEK, A., PISAREK, H., TAYLOR, J., DONG, J. Z., CULLER, M. D. & PAWLIKOWSKI, M. The effect of selective sst1, sst2, sst5 somatostatin receptors agonists, a somatostatin/dopamine (SST/DA) chimera and bromocriptine on the "clinically non-functioning" pituitary adenomas in vitro. *Life Sci* 2006 **78** 689-693.
131. FLORIO, T., BARBIERI, F., SPAZIANTE, R., ZONA, G., HOFLAND, L. J., VAN KOETSVELD, P. M., FEELDERS, R. A., STALLA, G. K., THEODOROPOULOU, M., CULLER, M. D., DONG, J., TAYLOR, J. E., MOREAU, J. P., SAVEANU, A., GUNZ, G., DUFOUR, H. & JAQUET, P. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocr Relat Cancer* 2008 **15** 583-596.
132. PEVERELLI, E., OLGATI, L., LOCATELLI, M., MAGNI, P., FUSTINI, M. F., FRANK, G., MANTOVANI, G., BECK-PECCOZ, P., SPADA, A. & LANIA, A. The dopamine-somatostatin chimeric compound BIM-23A760 exerts antiproliferative and cytotoxic effects in human non-functioning pituitary tumors by activating ERK1/2 and p38 pathways. *Cancer Lett* 2010 **288** 170-176.
133. BRONSTEIN, M. D., PARAIBA, D. B. & JALLAD, R. S. Management of pituitary tumors in pregnancy. *Nat Rev Endocrinol* 2011 **7** 301-310.

134. MOLITCH, M. E. Pituitary tumors and pregnancy. *Growth Horm IGF Res* 2003 **13 Suppl A** S38-44.
135. DEKKERS, O. M., VAN DER KLAUW, A. A., PEREIRA, A. M., BIERMASZ, N. R., HONKOOP, P. J., ROELFSEMA, F., SMIT, J. W. & ROMIJN, J. A. Quality of life is decreased after treatment for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 **91** 3364-3369.
136. PAGE, R. C., HAMMERSLEY, M. S., BURKE, C. W. & WASS, J. A. An account of the quality of life of patients after treatment for non-functioning pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997 **46** 401-406.
137. NIELSEN, E. H., LINDHOLM, J., LAURBERG, P., BJERRE, P., CHRISTIANSEN, J. S., HAGEN, C., JUUL, S., JORGENSEN, J., KRUSE, A. & STOCHHOLM, K. Nonfunctioning pituitary adenoma: incidence, causes of death and quality of life in relation to pituitary function. *Pituitary* 2007 **10** 67-73.
138. JOHNSON, M. D., WOODBURN, C. J. & VANCE, M. L. Quality of life in patients with a pituitary adenoma. *Pituitary* 2003 **6** 81-87.
139. MISSALE, C., NASH, S. R., ROBINSON, S. W., JABER, M. & CARON, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998 **78** 189-225.
140. VASSART, G. & COSTAGLIOLA, S. G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2011 **7** 362-372.
141. VILARDAGA, J. P., AGNATI, L. F., FUXE, K. & CIRUELA, F. G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J Cell Sci* 2010 **123** 4215-4220.
142. WHORTON, M. R., BOKOCH, M. P., RASMUSSEN, S. G., HUANG, B., ZARE, R. N., KOBILKA, B. & SUNAHARA, R. K. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 **104** 7682-7687.
143. WHORTON, M. R., JASTRZEBSKA, B., PARK, P. S., FOTIADIS, D., ENGEL, A., PALCZEWSKI, K. & SUNAHARA, R. K. Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *J Biol Chem* 2008 **283** 4387-4394.
144. PARK, P. S. & PALCZEWSKI, K. Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 **102** 8793-8794.
145. FONSECA, J. M. & LAMBERT, N. A. Instability of a class a G protein-coupled receptor oligomer interface. *Mol Pharmacol* 2009 **75** 1296-1299.
146. RENNER, U., ARZBERGER, T., PAGOTTO, U., LEIMGRUBER, S., UHL, E., MULLER, A., LANGE, M., WEINDL, A. & STALLA, G. K. Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 1368-1375.
147. VAN TOL, H. H., WU, C. M., GUAN, H. C., OHARA, K., BUNZOW, J. R., CIVELLI, O., KENNEDY, J., SEEMAN, P., NIZNIK, H. B. & JOVANOVIC, V. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 1992 **358** 149-152.
148. NETO, L. V., MACHADO EDE, O., LUQUE, R. M., TABOADA, G. F., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., QUINTELLA, L. P., NIEMEYER, P., JR., DE CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D. & GADELHA, M. R. Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 1931-1937.
149. FERONE, D., PIVONELLO, R., RESMINI, E., BOSCHETTI, M., REBORA, A., ALBERTELLI, M., ALBANESE, V., COLAO, A., CULLER, M. D. & MINUTO, F. Preclinical and clinical experiences with the role of dopamine receptors in the treatment of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007 **156 Suppl 1** S37-43.

150. MOLITCH, M. E., THORNER, M. O. & WILSON, C. Management of prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 **82** 996-1000.
151. COLAO, A., ANNUNZIATO, L. & LOMBARDI, G. Treatment of prolactinomas. *Ann Med* 1998 **30** 452-459.
152. ROWTHER, F. B., RICHARDSON, A., CLAYTON, R. N. & FARRELL, W. E. Bromocriptine and dopamine mediate independent and synergistic apoptotic pathways in pituitary cells. *Neuroendocrinology* 2010 **91** 256-267.
153. SAIARDI, A. & BORRELLI, E. Absence of dopaminergic control on melanotrophs leads to Cushing's-like syndrome in mice. *Mol Endocrinol* 1998 **12** 1133-1139.
154. PIVONELLO, R., FERONE, D., DE HERDER, W. W., KROS, J. M., DE CARO, M. L., ARVIGO, M., ANNUNZIATO, L., LOMBARDI, G., COLAO, A., HOFLAND, L. J. & LAMBERTS, S. W. Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 2452-2462.
155. BRESSON, D., BRANDI, A. M., NOUSBAUM, A., LE DAFNIET, M., RACADOT, J. & PEILLON, F. Evidence of dopamine receptors in human growth hormone (GH)-secreting adenomas with concomitant study of dopamine inhibition of GH secretion in a perfusion system. *J Clin Endocrinol Metab* 1982 **55** 589-593.
156. STEFANEANU, L., KOVACS, K., HORVATH, E., BUCHFELDER, M., FAHLBUSCH, R. & LANCRANJAN, L. Dopamine D2 receptor gene expression in human adeno/hypophysial adenomas. *Endocrine* 2001 **14** 329-336.
157. KOGA, M., NAKAO, H., ARAO, M., SATO, B., NOMA, K., MORIMOTO, Y., KISHIMOTO, S., MORI, S. & UOZUMI, T. Demonstration of specific dopamine receptors on human pituitary adenomas. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987 **114** 595-602.
158. BEVAN, J. S. & BURKE, C. W. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986 **25** 561-572.
159. TATENO, T., KATO, M., TANI, Y., OYAMA, K., YAMADA, S. & HIRATA, Y. Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas. *Endocr J* 2009 **56** 579-584.
160. SAVEANU, A. & JAQUET, P. Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas. *Rev Endocr Metab Disord* 2009 **10** 83-90.
161. BARAGLI, A., ALTURAIHI, H., WATT, H. L., ABDALLAH, A. & KUMAR, U. Heterooligomerization of human dopamine receptor 2 and somatostatin receptor 2 Co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer analysis. *Cell Signal* 2007 **19** 2304-2316.
162. HOFLAND, L. J., FEELDERS, R. A., DE HERDER, W. W. & LAMBERTS, S. W. Pituitary tumours: the sst/D2 receptors as molecular targets. *Mol Cell Endocrinol* 2010 **326** 89-98.
163. GUILLEMIN, R. & GERICH, J. E. Somatostatin: physiological and clinical significance. *Annu Rev Med* 1976 **27** 379-388.
164. STROWSKI, M. Z. & BLAKE, A. D. Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 2008 **286** 169-179.
165. PATEL, Y. C. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999 **20** 157-198.
166. DURAN-PRADO, M., GAHETE, M. D., MARTINEZ-FUENTES, A. J., LUQUE, R. M., QUINTERO, A., WEBB, S. M., BENITO-LOPEZ, P., LEAL, A., SCHULZ, S., GRACIA-NAVARRO, F., MALAGON, M. M. & CASTANO, J. P. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin

- receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 2634-2643.
167. DURAN-PRADO, M., SAVEANU, A., LUQUE, R. M., GAHETE, M. D., GRACIA-NAVARRO, F., JAQUET, P., DUFOUR, H., MALAGON, M. M., CULLER, M. D., BARLIER, A. & CASTANO, J. P. A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5TMD4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 **95** 2497-2502.
 168. FERONE, D., GATTO, F., ARVIGO, M., RESMINI, E., BOSCHETTI, M., TETI, C., ESPOSITO, D. & MINUTO, F. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol* 2009 **42** 361-370.
 169. CASARINI, A. P., JALLAD, R. S., PINTO, E. M., SOARES, I. C., NONOGAKI, S., GIANNELLA-NETO, D., MUSOLINO, N. R., ALVES, V. A. & BRONSTEIN, M. D. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary* 2009 **12** 297-303.
 170. BEVAN, J. S. Clinical review: The antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 1856-1863.
 171. TABOADA, G. F., LUQUE, R. M., NETO, L. V., MACHADO EDE, O., SBAFFI, B. C., DOMINGUES, R. C., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., FONTES, R., NIEMEYER, P., DE CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D. & GADELHA, M. R. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol* 2008 **158** 295-303.
 172. LAMBERTS, S. W., VAN DER LELY, A. J., DE HERDER, W. W. & HOFLAND, L. J. Octreotide. *N Engl J Med* 1996 **334** 246-254.
 173. JAQUET, P., SAVEANU, A., GUNZ, G., FINA, F., ZAMORA, A. J., GRINO, M., CULLER, M. D., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A. & OUAFIK, L. H. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 781-792.
 174. VAN DER HOEK, J., LAMBERTS, S. W. & HOFLAND, L. J. Preclinical and clinical experiences with the role of somatostatin receptors in the treatment of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007 **156 Suppl 1** S45-51.
 175. ZATELLI, M. C., PICCIN, D., BOTTONI, A., AMBROSIO, M. R., MARGUTTI, A., PADOVANI, R., SCANARINI, M., TAYLOR, J. E., CULLER, M. D., CAVAZZINI, L. & DEGLI UBERTI, E. C. Evidence for differential effects of selective somatostatin receptor subtype agonists on alpha-subunit and chromogranin a secretion and on cell viability in human nonfunctioning pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 5181-5188.
 176. O'TOOLE, D., SAVEANU, A., COUVELARD, A., GUNZ, G., ENJALBERT, A., JAQUET, P., RUSZNIEWSKI, P. & BARLIER, A. The analysis of quantitative expression of somatostatin and dopamine receptors in gastro-entero-pancreatic tumours opens new therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol* 2006 **155** 849-857.
 177. AL-SHRAIM, M. & ASA, S. L. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: what is new? *Acta Neuropathol* 2006 **111** 1-7.
 178. OSAMURA, R. Y., KAJIYA, H., TAKEI, M., EGASHIRA, N., TOBITA, M., TAKEKOSHI, S. & TERAMOTO, A. Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol* 2008 **130** 495-507.
 179. NISHIOKA, H., TAMURA, K., IIDA, H., KUTSUKAKE, M., ENDO, A., IKEDA, Y. & HARAOKA, J. Co-expression of somatostatin receptor subtypes and estrogen

- receptor-alpha mRNAs by non-functioning pituitary adenomas in young patients. *Mol Cell Endocrinol* 2011 **331** 73-78.
180. SU, Z., WANG, C., WU, J., JIANG, X., CHEN, Y., ZHENG, W., ZHUGE, Q., WU, Z. & ZENG, Y. Expression of dopamine 2 receptor subtype mRNA in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurol Sci* 2011.
 181. GREENMAN, Y., TORDJMAN, K., OSHER, E., VESHCHEV, I., SHENKERMANN, G., REIDER, GROSWASSER, II, SEGEV, Y., OUAKNINE, G. & STERN, N. Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005 **63** 39-44.
 182. DE BRUIN, C., PEREIRA, A. M., FEELDERS, R. A., ROMIJN, J. A., ROELFSEMA, F., SPRIJ-MOOIJ, D. M., VAN AKEN, M. O., VAN DER LELIJ, A. J., DE HERDER, W. W., LAMBERTS, S. W. & HOFLAND, L. J. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 1118-1124.
 183. WANG, F., FLANAGAN, J., SU, N., WANG, L. C., BUI, S., NIELSON, A., WU, X., VO, H. T., MA, X. J. & LUO, Y. RNAscope A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagn* 2012 **14** 22-29.
 184. FREDA, P. U., KATZNELSON, L., VAN DER LELY, A. J., REYES, C. M., ZHAO, S. & RABINOWITZ, D. Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 4465-4473.
 185. CAP, J., MAREKOVA, M., CERMAN, J., MALIROVA, E., SUBA, P., NETUKA, D., HANA, V. & MAREK, J. Inhibition of hormone secretion in GH-secreting pituitary adenomas by receptor-subtype specific somatostatin analogues in vitro. *Gen Physiol Biophys* 2003 **22** 201-212.
 186. SHIMON, I., YAN, X., TAYLOR, J. E., WEISS, M. H., CULLER, M. D. & MELMED, S. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *J Clin Invest* 1997 **100** 2386-2392.
 187. CAP, J., NEMECEK, S., REZACOVA, M. & CERMAN, J. Možnosti medikamentózní léčby akromegalie. *Cas Lek Cesk* 2005 **144** 33-37.
 188. FERONE, D., DE HERDER, W. W., PIVONELLO, R., KROS, J. M., VAN KOETSVELD, P. M., DE JONG, T., MINUTO, F., COLAO, A., LAMBERTS, S. W. & HOFLAND, L. J. Correlation of in vitro and in vivo somatotropic adenoma responsiveness to somatostatin analogs and dopamine agonists with immunohistochemical evaluation of somatostatin and dopamine receptors and electron microscopy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** 1412-1417.
 189. SAVEANU, A., GUNZ, G., DUFOUR, H., CARON, P., FINA, F., OUAFIK, L., CULLER, M. D., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A. & JAQUET, P. Bim-23244, a somatostatin receptor subtype 2- and 5-selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86** 140-145.
 190. SAVEANU, A., MORANGE-RAMOS, I., GUNZ, G., DUFOUR, H., ENJALBERT, A. & JAQUET, P. A luteinizing hormone-, alpha-subunit- and prolactin-secreting pituitary adenoma responsive to somatostatin analogs: in vivo and in vitro studies. *Eur J Endocrinol* 2001 **145** 35-41.
 191. FEELDERS, R. A., DE BRUIN, C., PEREIRA, A. M., ROMIJN, J. A., NETEA-MAIER, R. T., HERMUS, A. R., ZELISSEN, P. M., VAN HEEREBEEK, R., DE JONG, F. H., VAN DER LELY, A. J., DE HERDER, W. W., HOFLAND, L. J. & LAMBERTS, S. W. Pasireotide alone or with cabergoline and ketoconazole in Cushing's disease. *N Engl J Med* 2010 **362** 1846-1848.

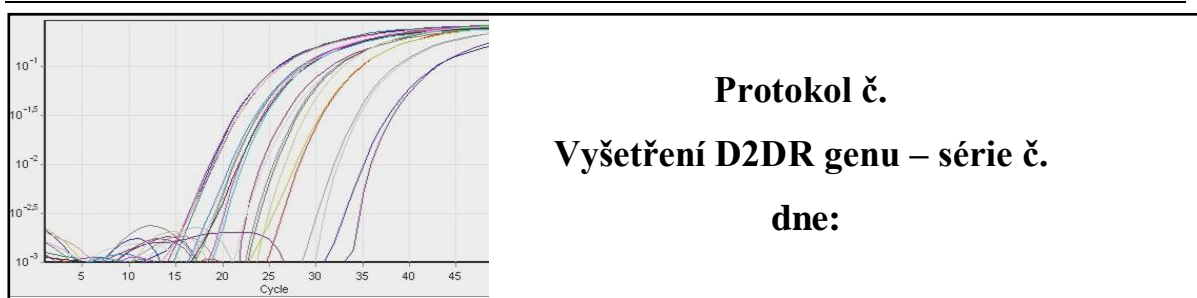
192. SAVEANU, A., LAVAQUE, E., GUNZ, G., BARLIER, A., KIM, S., TAYLOR, J. E., CULLER, M. D., ENJALBERT, A. & JAQUET, P. Demonstration of enhanced potency of a chimeric somatostatin-dopamine molecule, BIM-23A387, in suppressing growth hormone and prolactin secretion from human pituitary somatotroph adenoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 **87** 5545-5552.
193. FUSCO, A., GUNZ, G., JAQUET, P., DUFOUR, H., GERMANETTI, A. L., CULLER, M. D., BARLIER, A. & SAVEANU, A. Somatostatinergic ligands in dopamine-sensitive and -resistant prolactinomas. *Eur J Endocrinol* 2008 **158** 595-603.
194. JAQUET, P., GUNZ, G., SAVEANU, A., DUFOUR, H., TAYLOR, J., DONG, J., KIM, S., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A. & CULLER, M. D. Efficacy of chimeric molecules directed towards multiple somatostatin and dopamine receptors on inhibition of GH and prolactin secretion from GH-secreting pituitary adenomas classified as partially responsive to somatostatin analog therapy. *Eur J Endocrinol* 2005 **153** 135-141.
195. SLABY, O., SACHLOVA, M., BEDNARIKOVA, M., FABIAN, P., SVOBODA, M., VYTOPILOVA, S., VALIK, D. & VYZULA, R. Gene expression of somatostatin receptor 4 predicts clinical outcome of patients with metastatic neuroendocrine tumors treated with somatostatin analogs. *Cancer Biother Radiopharm* 2010 **25** 237-243.
196. SALMAGGI, A. & LODRINI, S. Commentary on "Expression of dopamine 2 receptor subtypes mRNA in clinically nonfunctioning pituitary adenomas". *Neurol Sci* 2011.

12 Seznam příloh

Příloha č. 1 – Protokol izolace, reverzní transkripce a real-time PCR pro D2DR

Příloha č. 2 – Informovaný souhlas

Příloha č. 1



1. Izolace RNA z tkáně hypofýz

POSTUP PŘI IZOLACI RNA POMOCÍ TRIZOLU

Závazné instrukce: Veškeré chemikálie se uchovávají v chladnici nebo v mraznici v místnosti B413. Veškeré manipulace s roztoky a biologickým materiálem musí být prováděny poučenou osobou v rukavicích a v laminárním boxu. Špičky s filtrem jsou vždy jen na jedno použití. Všechny roztoky musí být opatřeny štítkem s čitelným názvem roztoku, s údajem o koncentraci, datem přípravy a podpisem osoby, která roztok připravila. Všechny operace s RNA, jako snadno fragmentovatelnou molekulou, se provádějí pokud možno rychle a při teplotě blízké 0 °C.

1. Tkáň z RNAlateru přenést po rozmražení špičkou do zkumavky MagNA Lyser Green Beads naplněné 1000 ul Trizolu (Invitrogene). Zaznamenat odhad velikosti sedimentu tkáně do tabulky (TM = malá – téměř není vidět, TV = velká – asi 1 mm, TVV = velmi velká – nad 1 mm)
2. Centrifugu CR322 nechat předchladit na teplotu 4 °C.
3. Nastavit MagNA Lyser: 7000 speed, 60 cyklů za 1 s, na 90 s zkumavky do kovového bloku. Pokud je tkáň nadále celistvá, homogenizační cyklus opakovat ještě 2x s chlazením v kovovém bloku po každém cyklu na 90 vteřin.
4. Odpipetovat tekutou složku do čisté zkumavky (nad kuličkami musí zůstat asi 1 mm vrstva).

5. Do zkumavky přidat 200 μ l chloroformu/isoamylalkoholu a temperovat při laboratorní teplotě 10 minut (lze použít digitálního vortexu na stole).
6. V předchlazené centrifuze točit při 13000 rpm 15 minut při 4 °C.
7. Odseparovat supernatant po 100 μ l (celkem asi 300 μ l) a přidat k němu 850 μ l isopropanolu (je v mrazáku), ponechat vše v -20 °C přes noc.
8. Ráno nachladit centrifugu CR322 a poté točit zkumavky 15 minut při 4 °C, odstranit supernatant nad peletou NK a objem doplnit 850 μ l 70% ethanolu, vše promíchat natahováním do pipety a vše cca 5 s vortexovat. V této fázi je RNA stabilizována.
9. Točit při 4 °C 10 min, zaznamenat velikost RNA pelety (**PM = peleta malá – téměř není vidět, PV = peleta velká – asi 1 mm, PVV = peleta velmi velká – nad 1 mm**), odstranit veškerý supernatant, pipetou odsát veškeré kapky okolo ústí zkumavky, po stěnách i okolo vytvořené mikropelety.
10. Sušit pelety 10 min při 56 °C do vysušení s otevřenými víčky.
11. Pelety resuspendovat v 50 μ l voda pro injectio. Vodu pipetujeme na stěnu těsně nad peletu v šikmé pozici eppendorfky a poté necháme volně klesnout přes peletu ke dnu. Pokud je peleta viditelně větší než 1,5 mm, objem vody se zvyšuje na trojnásobek, tedy 150 μ l. Zaznamenat tento nadbytek eluentu do tabulky jako poznámku „**150 μ l**“.
12. Resuspendace pelety probíhá po dobu 10 minut v termobloku předehřátém na teplotu 56 °C.
13. RNA v roztoku je ihned používána k přímé spektrofotometrii (2 μ l) v Nanodropu 1000 a k reverzní transkripci (v případě nutnosti ji lze zamrazit na -70 °C). Manipulace s RNA musí být při teplotě v chladu – v předchlazené krabici.

	Identifikace vzorku	Čistota RNA	Kvantita RNA	(Kvantita RNA po naředění vodou 1:1) 30 + 30	Objem RNA do RT (Invitrogene) 1200 / RNA	Objem vody pro doplnění (Invitrogene) 16 - RNA	Poznámky k ředění a kvantitě RNA
1							
2							
3							
4							
5							

2. Reverzní transkripce kitem Invitrogen

Pracovní místnost: B413 (laminární box) + B431 (místnost na míchání směsí PCR)

Závazné instrukce: *Veškeré chemikálie se uchovávají v chladnici nebo v mraznici. Manipulace musí být prováděny v rukavicích a v laminárním boxu. Všechny operace s RNA, jako snadno fragmentovatelnou molekulou, se provádějí pokud možno rychle a při teplotě blízké 0° C.*

Výpočet: $1200 / (\text{koncentrace RNA v ng/}\mu\text{l}) \dots$ Získáme objem RNA do reakce. Tento objem odečteme od 16 μl a zbytek doplníme RNA-free vodou. Při kvantitě RNA vyšší než 300 ng/ μl , RNA naředíme před použitím 2x (30 μl RNA + 30 μl vody). Při kvantitě nižší než 75 ng/ μl , pipetujeme automaticky celých 16 μl RNA bez přídavku vody.

1. Z místnosti B431 z mrazáku vyndat předchlazenou krabičku a do ní připravit počet mikrozkušavek odpovídající počtu vyšetřovaných vzorků, případně kontrol. Reverzní transkripci provádíme **v dubletech**. Zkušavky označit číselně. Krabičku přenést do laminárního boxu v místnosti B413. Z mrazáku v B413 vyndat do chladnice namražený kovový blok.
2. Do mikrozkušavek napipetovat **16 µl** (v dubletu) koncentračně optimalizované RNA a vodu dle tabulky, zkušavky uzavřít a přenést do termocykléru ABI 2720 (napravo, **program „denaturace RNA“** je pod uživatelem „Martin“). Zde provést denaturaci RNA při 70 °C po dobu 10 minut. Denaturace je nastavena na dobu 15 minut. Během této doby je třeba připravit kompletní master mix pro reverzní transkripci.
3. V místnosti B431 připravit mastermix (reagencie pro RT v originální krabičce v mrazáku) do předchlazené krabičky.
4. Do kovového bloku temperovaného v chladnici vyjmout denaturované RNA vzorky z termocykléru.
5. Nechat mikrozkušavky cca 4 minuty temperovat v bloku v místnosti B413 a poté k nim připipetovat **24 µl** master mixu (v dubletu) pro reverzní transkripci. Pokud by RNA byla zmrazena, opakovaným pohybem pístu pipety obě složky homogenizovat do rozpuštění ledu.
6. Ve stejném cykléru vyhledat program reverzní transkripce Invitrogen (25 °C 10 min, 50 °C 50 min, 85 °C 5 min, **program „rt-super“**), vložit zkušavky z bodu 5 do cykléru, provést reverzní transkripci a poté přenést cDNA do místnosti B413.
7. cDNA (2x40 µl) použít nebo skladovat do doby použití při -80 °C.

Při přípravě pracujeme s master mixy (2x počet tkání + 1)	
	1 rce
2x RT Reaction Mix	20 µl
RT Enzyme Mix	4 µl
CELKEM:	24 µl

3. REAL-TIME PCR

Veškeré Vzorky jsou vyšetřeny v dubletu od fáze reverzní transkripce.

- 1) Do chladicího kovového bloku vložíme na předchlazení mikrozkušavky pro amplifikaci v malých objemech (zkumavky i víčka jsou v izolační místnosti ve skříňce nad velkou centrifugou Jouan).
- 2) Z mrazáku (střední zásuvka) v místnosti na izolaci DNA vyndat a nechat rozmrazit jeden vybraný (uveden v tabulce) z kalibrátorů pro D2DR a GUS, cDNA konkrétních pacientů, kontroly a demi vodu pro PCR pro negativní kontrolu.
- 3) Namíchat mastermixy do 1,5 ml eppendorfků pro geny dle rozpisu a v izolační místnosti dopipetovat 5 µl cDNA a poté zavičkovat čtveřice. Fixou označit na víčku vždy první zkumavku ze čtyř.

<i>GUS (Při přípravě pracujeme s master mixy (počet vzorků + 2)</i>	
	1 reakce
TaqMan Universal PCR Master Mix 2 x (AB)	12,5 µl
Ipsogen primery a sondy	1 µl
Voda	6,5 µl
Celkem	20 µl
cDNA (RT Ipsogen)	5 µl

<i>D2DR (Při přípravě pracujeme s master mixy (počet vzorků + 2)</i>	
	1 reakce
TaqMan Universal PCR Master Mix 2 x (AB)	12,5 µl
Primer D2 forward TIB	1,2 µl
Primer D2 reverse TIB	1,2 µl
Sonda D2 probe	1,7 µl
Voda	3,4 µl
Celkem	20 µl
cDNA (RT Ipsogen)	5 µl

- 4) Rozpipetovat master mixy po 20 µl, přidat 5 µl cDNA (vodu v negativní kontrole).
- 5) Vložit zkumavky do rotoru ve správném pořadí (první ze čtveřice je vždy ta označená).
- 6) Zapnout Rotor-Gene 6000 pro lidský genom
- 7) Otevřít "Rotor-Gene 6000 series Software 1.7"
- 8) Odkliknout „New Run“ a v roletce odkliknout "GABA"
- 9) Kliknout na GUS templát", kde jsou nastaveny parametry {50 °C 2 min, 95 °C 10 min, PCR 50 cyklů 95 'C 15 sec a 60 'C 1 minuta.
- 10) Na obrázku odkliknout 72-Welt Rotor a poté i Locking Ring Attached.
- 11) NEXT, do položky „NOTES“ vložit dnešní datum a Vaše příjmení.
- 12) NEXT, odkliknout START RUN
- 13) Uložit v „Save As“ - dle příkladu: 2008-11_06 čili datum 6.11.2008) a Potvrdit.
- 14) Stroj se rozjede a před Vámi se objeví tabulka, vyplňte jména vzorků (příjmení a název kalibrátoru, kontrol), v posledním sloupci změňte vše na YES, u kalibrátoru vyplňte typizaci na STANDARD a zadejte
- 15) hodnotu koncentrace. Na tuto činnost máte asi 130 minut.
- 16) Analýza
- 17) Po analýze vypni PC, Rotor-Gene, otevři kryt stroje, odstraň kovový kruh, vyjmi do sáčku použité zkumavky, vyjmi prázdný rotor, kryt uzavři.

Příloha č. 2

INFORMOVANÝ SOUHLAS

Analýza exprese dopaminových receptorů na adenomech hypofýzy.

1. Úvod

Toto sdělení slouží k úplnému informování pacienta před tím, než dá svůj souhlas k použití vzorku odoperovaného hypofyzárního nádoru pro jeho analýzu. Informovaný souhlas musí být opatřen datem a vlastnoručním podpisem pacienta. Tento souhlas je zcela dobrovolný a nemá vliv na další léčbu.

Výzkumný projekt je zaměřen na analýzu dopaminových receptorů u nádorů hypofýzy, jejichž ovlivnění pomocí dopaminových agonistů by v budoucnu mohlo přinést nové terapeutické možnosti. Současná data se různí a není jednoznačně jasné, které hypofyzární nádory, mimo prolaktinomů, jsou k léčbě vhodné. Popřípadě kdy by léčba dopaminovými agonisty zabránila recidivě nádoru po operaci. Tento prospěch však nelze zaručit.

Veškeré získané osobní údaje o pacientovi jsou přísně důvěrné, získaná data z rozboru vzorků tumoru budou publikována se zachováním anonymity.

2. Cíl projektu

Cílem projektu je analyzovat kvantitativně expresi dopaminových receptorů na adenomech hypofýzy, zejména klinicky afunkčních a vytipovat skupinu vhodnou k léčbě dopaminovými agonisty.

3. Odběr vzorku

Neurochirurg během operace dle zvoleného přístupu odstraní pacientovy nádor hypofýzy. Z odoperovaného tumoru odebere část, která bude zamrazena a odeslána do naší laboratoře. Zde bude v čase zpracována na pracovišti molekulární biologie, kde bude pomocí RT-PCR analyzována mRNA dopaminových receptorů a současně bude vzorek vyšetřen imunohistochemickými metodami na přítomnost hormonálních působků.

V žádném případě nebude odebírána, hodnocena a ani uchovávána DNA pacienta.

Zbývá část odoperovaného tumoru bude odeslána na histologické vyšetření jako je běžné při standardním operačním postupu. Léčba před, v průběhu a po operaci nebude žádným způsobem změněna.

4. Rizika a vedlejší účinky

Rizika odběru vzorku jsou shodná s rizikem neurochirurgického odstranění tumoru hypofýzy, které pacient podstupuje v rámci zvolené terapie. Žádná nová rizika náš projekt nepřináší. Studie nijak neovlivní postup operatéra.

5. Práva a povinnosti

Pacient si musí být vědom toho, že výsledky vyšetření odebraných vzorků mohou být přístupné pověřeným osobám, které s nimi ovšem budou zacházet jako s přísně důvěrnými. V případě zveřejnění výsledků provedených studií je zaručena anonymita pacientů. Pacient má právo na informace o výsledcích provedených vyšetření.

6. Prohlášení

Od svého lékaře jsem obdržel(a) úplné a srozumitelné vysvětlení týkající se odběru pro výzkumný projekt Analýzy dopaminových receptorů u nádorů hypofýzy. Měl(a) jsem příležitost zeptat se na jakékoli otázky, které s projektem souvisí. Přečetl(a) jsem si pečlivě tento informovaný souhlas a souhlasím s poskytnutím části odebraného vzorku nádoru hypofýzy.

Jméno pacienta	Datum	Podpis pacienta
----------------	-------	-----------------

Pacienta informoval(a)

MUDr. _____

Jméno lékaře	Datum	Podpis lékaře
--------------	-------	---------------