

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Klinická biochemie

**Molekulárně biologická vyšetření somatostatinových receptorů v diagnostice
hypofyzárních nádorů**

**Molecular biology investigation of somatostatin receptors in diagnostics of pituitary
tumors**

Školitel: doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Školitel konzultant: prof. MUDr. Jan Čáp, CSc.

Hradec Králové, květen 2015

Obhajoba dne: 3.9.2015

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla 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 mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, květen 2015

Mgr. Monika Drastíková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svým školitelům doc. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D. a prof. MUDr. Janu Čápovi, CSc. za odborné vedení, rady a cenné připomínky týkající se nejen realizace této práce. Dále bych chtěla poděkovat neurochirurgům MUDr. Tomáši Česákovi, Ph.D. z Neurochirurgické kliniky FN Hradec Králové, doc. MUDr. Davidu Netukovi, Ph.D. a pplk. MUDr. Václavu Masopustovi z Neurochirurgické a neuroonkologické kliniky 1. LF UK a ÚVN Praha za množství nasbíraných kvalitních vzorků, bez kterých by tato práce nevznikla. MUDr. Filipu Gabalcovi, Ph.D. bych chtěla poděkovat za organizaci sběru a transportu vzorků, a také za klinické hodnocení dat.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i kolegům z Úseku molekulární biologie ÚKBD FN Hradec Králové za toleranci a trpělivost během experimentální části této disertační práce prováděné v laboratoři.

Práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou UK (grant č. 723912) a Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví IGA NT 11344-4/2010.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Nádory hypofýzy a jejich léčba - úvod do problematiky	11
2.1	Charakteristika adenomů hypofýzy	11
2.1.1	Klasifikace adenomů hypofýzy	11
2.1.2	Epidemiologie adenomů hypofýzy	17
2.1.3	Patofyziologie hypofyzárních adenomů	19
2.1.4	Symptomatologie a diagnostika adenomů hypofýzy	22
2.1.5	Léčba adenomů hypofýzy	31
2.2	Somatostatin a somatostatinové receptory	37
2.2.1	Struktura somatostatinu.....	37
2.2.2	Funkce somatostatinu v organismu	40
2.2.3	Struktura somatostatinových receptorů.....	41
2.2.4	Přenos signálu prostřednictvím SSTR	44
2.2.5	Somatostatinová analoga.....	45
2.2.6	Terapeutický efekt somatostatinových analog v léčbě adenomů hypofýzy...48	
2.3	Estrogeny a estrogenové receptory	49
2.3.1	Estrogeny a jejich účinek	49
2.3.2	Estrogenové receptory	50
2.3.3	Modulátory estrogenových receptorů v léčbě adenomů hypofýzy.....	52
3	Cíle disertační práce	54
4	Použité metody a soubor nemocných.....	55
4.1	Soubor vyšetřovaných pacientů.....	55
4.2	Klinická a imunohistochemická charakteristika adenomů.....	55
4.3	Molekulárně biologická analýza exprese receptorů.....	55
4.3.1	Extrakce RNA	55

4.3.2	Reverzní transkripce	57
4.3.3	Real-time PCR.....	57
4.4	Statistická analýza.....	59
5	Výsledky.....	60
5.1	Určení normality hodnot exprese receptorů.....	60
5.2	Hodnocení exprese receptorů v závislosti na diagnóze	61
5.3	Expresní profily jednotlivých typů hypofyzárních adenomů	65
5.4	Exprese receptorů u KAA v závislosti na věku.....	68
5.5	Exprese receptorů u KAA v závislosti na pohlaví.....	69
5.6	Exprese receptorů u KAA v závislosti na velikosti tumoru.....	70
5.7	Exprese receptorů u KAA v závislosti na místu a směru infiltrace tumoru.....	71
5.8	Exprese receptorů u KAA v závislosti na imunohistochemické klasifikaci	73
5.9	Porovnání míry vzájemné exprese receptorů u KAA	75
6	Diskuse	77
7	Závěry.....	83
8	Použitá literatura	85

Použité zkratky

ACTH	adrenokortikotropní hormon
AF-1	aktivační funkce 1
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
Cdk	cyklin-dependentní kináza
cDNA	complementary DNA
CT	počítačová tomografie
DA	dopaminergní agonisté
DBD	DNA-vázající doména
DR	dopaminové receptory
D2R	dopaminový receptor typu 2
EGF	epidermal growth factor
ER	estrogenové receptory
ER1	estrogenový receptor typu 1
ERE	estrogen responsive elements
FGF2	fibroblast growth factor 2
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FSH	folikuly stimulující hormon
ft3	volný trijódtyronin
ft4	volný tyroxin
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GH	hypofyzární růstový hormon
GHRH	somatotropin stimulující hormon
GUS	beta-glukuronidáza
HDL	high density lipoprotein
HMEC	human dermal microvascular endothelial cells
HPRT	hypoxantinfosforibozyltransferáza
HSP 90	heat-shock protein 90
ICHS	ischemická choroba srdeční

IFN- γ	interferon gama
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor-1
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
KAA	klinicky afunkční adenom
LAR	long-acting depot formulation
LBD	ligand binding domain
LDL	low density lipoprotein
LH	luteinizační hormon
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NMR	nukleární magnetické rezonance
NTD	N-terminální doména
PDGF	platelet derived growth factor
PRL	prolaktin
PTTG	pituitary tumor transforming gene
SA	somatostatinová analoga
STH	růstový hormon
SST	somatostatin
SSTR	somatostatinové receptory
T3	trijódtyronin
T4	tyroxin
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF α	tumor necrosis faktor alpha
TSH	tyreotropní hormon
UFC	volný močový kortizol
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Úvod

Nádory hypofýzy se řadí mezi jedny z nejčastějších afekcí hypofýzy a bývají v naprosté většině benigní [Colao et al. 2010]. Jejich prevalence v populaci se udává mezi 10–27 % [Dekkers et al. 2008]. Adenomy hypofýzy se dělí na adenomy funkční, pro které je charakteristická nadprodukce některého z hormonů (růstový hormon, prolaktin, adrenokortikotropní a tyreotropní hormon), a klinicky afunkční (KAA), u kterých hormonální hypersekrece chybí [Colao et al. 2008].

KAA představují zhruba třetinu všech adenomů hypofýzy [Katznelson et al. 1993]. Často se jedná o tzv. mikroadenomy, které pacientovi nepůsobí žádné obtíže [Molitch 2008]. Na rozdíl od funkčních adenomů jsou KAA často prokazovány náhodně při jiném vyšetření pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) nebo počítačové tomografie (CT) [Taboada et al. 2007]. Ve většině případů bývají odhaleny, až když dorostou do velikosti makroadenomů (>1cm) a projevují se příznaky z útlaku okolních struktur. Nejčastěji se jedná o poruchu zraku (67,8 %), bolesti hlavy (41,4 %) a hypogonadismus (43,3 %) [Colao et al. 2008].

Adenomy hypofýzy představují heterogenní skupinu, a proto se i jejich léčba liší podle typu a velikosti tumoru. Nejrychlejším způsobem léčby je neurochirurgický zákrok, který však jen málokdy vede k úplnému odstranění adenomu a často zůstává přítomno reziduum nádoru [Taboada et al. 2007]. K opětovnému nárůstu nádorové hmoty dochází zhruba u 40–50 % pacientů, není-li použita následná radioterapie [Comtois et al. 1991, Gittoes et al. 1998]. Vhodnost použití radioterapie je však vzhledem k jejím nežádoucím účinkům diskutabilní [Dekkers et al. 2008]. Proto se dnes do popředí dostává medikamentózní léčba, která je např. u prolaktinomů metodou první volby [Lamberts et al. 1990].

Nově jsou využívána somatostatinová analoga (SA). I přes dobrou odpověď KAA na SA v podmínkách *in vitro* (buněčné modely), je zatím k dispozici jen omezené množství informací o účinnosti SA při jejich klinické aplikaci. U KAA léčených SA v monoterapii po dobu 6 měsíců došlo ke zmenšení nádoru pouze ve 12 % případů, u pacientů však odezněly zrakové obtíže a vymizely bolesti hlavy [Colao et al. 2008].

Rozporuplná experimentální a klinická data jsou v současnosti velkou výzvou pro odborníky v biomedicinském výzkumu, zejména pro buněčné a molekulární biology směřující k objasnění patofyziologie KAA na molekulární úrovni, a k navržení cíleného a

individualizovaného způsobu jejich léčby. K shrnutí současných znalostí o nádorech hypofýzy a k definování expresního profilu jejich cytoplazmatických receptorů s ohledem na možnou cílenou léčbu SA či jinými syntetickými analogy by mohla přispět i tato disertační práce.

2 Nádory hypofýzy a jejich léčba - úvod do problematiky

2.1 Charakteristika adenomů hypofýzy

Hypofyzární adenomy jsou považovány za benigní pomalu rostoucí neinvazivní nemetastazující monoklonální tumory tvořené z vysoce diferencovaných adenohipofyzárních buněk, které si zachovávají mnohé vlastnosti buněk normálních [Davis et al. 1999]. Histologicky jsou velice rozmanité, což ilustruje cytodiferenční schopnosti hypofýzy.

První zmínky o hypofyzárních nádorech sahají až do roku 1641, kdy byl u mladého muže *post mortem* popsán nález adenomu velikosti "slepičího vejce". Muž postupně ztrácel zrak a trpěl křečemi a slabostí. Od té doby byla dokumentována celá řada případů s podobnou symptomatologií, u kterých byla prokázána přítomnost nádoru hypofýzy. Pierre Marie se svým článkem o akromegalii v roce 1886 stal průkopníkem v oblasti výzkumu hypofýzy a hypofyzárních nádorů [Thapar et al. 2000].

2.1.1 Klasifikace adenomů hypofýzy

Nádory hypofýzy mohou být klasifikovány na základě celé řady hledisek, jako je velikost a invazivita adenomu, endokrinní aktivita, množství a funkčnost produkovaných hormonů, barvení a granularita cytoplazmy nebo imunohistochemie. Obecně by klasifikace měla být jednoduchá a zároveň dostatečně flexibilní, aby ji bylo možné co nejrychleji upravovat na základě aktuálních poznatků.

Nové sofistikované technologie umožňují hlubší pohled do biologického chování a cytogeneze buňky adenomu, včetně objasnění strukturálních a funkčních vztahů na úrovni jednotlivých molekul. Velkou měrou tak přispívají k vylepšení stávajících klasifikačních schémat. Správná klasifikace nádoru a určení jeho stádia jsou nezbytné podmínky pro rozhodnutí o optimální léčebné strategii [Kovacs et al. 2001].

2.1.1.1 Klasifikace založená na imunohistochemickém barvení

Původní klasifikace nádorů hypofýzy byla založena na běžném histologickém barvení hematoxylinem a eozinem, na základě kterého se endokrinní buňky dělily na chromofóbní a chromofilní, a ty pak dále na acidofilní a bazofilní podle toho, zda vázaly kyselá nebo bazická barviva [Lester 2013]. Kromě běžných barvicích metod se stále více prosazuje klasifikace založená na kombinaci imunohistochemických a elektronově mikroskopických

metod [Arafah et al. 2001]. Pomocí těchto technik bylo prokázáno, že každý hormon hypofýzy je produkován jiným typem buněk, které se liší vzhledem i velikostí granul.

Chromofóbní buňky představují více než polovinu buněk adenohypofýzy a je pro ně typické málo intenzivní barvení běžnými barvivy. Vyskytují se častěji ve skupinách v centrálních oblastech adenohypofýzy. Při pozorování ve světelném mikroskopu nebyla objevena sekreční granula, avšak jejich ojedinělý výskyt byl prokázán elektronově mikroskopickým vyšetřením. Tento nález svědčí o tom, že se pravděpodobně jedná o nezralé nebo vyčerpané (degranulované) buňky chromofilní [Herlant 2013]. Důležitý typ představují tzv. folikulostelární buňky, které zaujímají zhruba 5–10 % všech hypofyzárních buněk [Marek 2007]. Mají hvězdčovitý tvar vytvářející trojrozměrnou hustou síť obklopující hormonálně aktivní buňky. Vyznačují se schopností fagocytovat apoptotické zbytky buněk a produkovat celou řadu růstových faktorů a cytokinů. Díky tomu hrají významnou roli při přenosu signálu, a tím zajišťují bezprostřední koordinaci všech buněk v celé hypofýze [Devnath 2008].

Acidofilní buňky měří v průměru 12–15 μm a nacházejí se ve větším počtu v periferních oblastech *pars distalis*, kde tvoří zhruba 40 % buněk. Na základě imunocytochemického a elektronově mikroskopického vyšetření se dělí na buňky somatotropní a laktotropní [Lullmann-Rauch 2012, Mačák et al. 2012]. Bylo však jednoznačně prokázáno, že acidofilní adenomy mohou produkovat i jiné typy hormonů, např. prolaktin nebo mohou představovat klinicky neaktivní nádory [Kovacs et al. 2001].

Bazofilní buňky jsou obvykle větší než buňky acidofilní a tvoří 10 % hypofyzárních buněk. Nacházejí se spíše v centrálních partiích adenohypofýzy. Dělí se na buňky tyreotropní, gonadotropní a kortikotropní [Lullmann-Rauch 2012, Mačák et al. 2012]. Avšak tiché kortikotropní adenomy nejsou spojovány se zvýšenou produkcí adrenokortikotropního hormonu, a také mohou syntetizovat jiné typy hormonů. Jednotlivé zastoupení chromofilních buněk v hypofýze a hormony, které produkují, jsou znázorněny v tabulce 1.

Tabulka 1 Rozdělení dle typu chromofilních buněk a jejich relativní zastoupení v rámci této skupiny, včetně produkovaných hormonů [Parez-Castro et al. 2012]

Typ buněk	Relativ. zastoupení	Produkovaný hormon	Histologické barvení
Somatotropní	40–50 %	Růstový hormon (STH, GH)	acidofilní
Kortikotropní	15–20 %	Adrenokortikotropní hormon (ACTH)	bazofilní
Laktotropní	15 %	Prolaktin (PRL)	acidofilní
Gonadotropní	10 %	Folikuly stimulující hormon (FSH) Luteinizační hormon (LH)	bazofilní
Tyreotropní	5 %	Tyreotropní hormon (TSH)	bazofilní

2.1.1.2 Klasifikace založená na sekreci hormonů

Adenomy hypofýzy jsou stále častěji děleny na základě produkovaného hormonu. Z endokrinologického hlediska jsou klasifikovány na adenomy afunkční a funkční, a ty pak jsou dále klasifikovány dle hypersekrece příslušného hormonu [Quereda et al. 2009] Základní členění je znázorněno v tabulce 2. Průměrné hodnoty prevalence vypočítané na základě hodnot v tabulce 2 ukazuje tabulka 3.

Tabulka 2 Výskyt jednotlivých typů adenomů v populaci

Prolaktinom (%)	KAAs (%)	GH adenom (%)	ACTH adenom (%)	TSH adenom (%)	autor
66,2	14,7	13,2	5,9	x	Daly et al. 2006
42,5	22,5	20,0	11,0	1,5	Arafah et al. 2001
x	30,0	x	x	x	Dekkers et al. 2008
29,0	x	13,0	10,0	1,0	Kovacs et al. 2001
50,0	30,0	17,5	7,5	1,0	Dworakowska 2012
29,0	31,0	11,0	10,0	1,0	Melmed 2003
27,0	27,1	14,5	9,6	1,1	McLendon 2006
43,0	x	2,8	4,9	0,9	Ezzat et al. 1994
57,0	28,0	11,0	2,0	x	Fernandez-Ballsells et al. 2011
39,5	x	8,4	13,8	x	Freda et al. 2011

Poznámka: symbolem "x" jsou označeny položky, u kterých nebyl údaj v citaci uveden.

Tabulka 3 Přehled adenomů s prevalencí a hypersekrečním syndromem

Typ adenomu	Prevalence	Hormon	Hypersekreční syndrom
Somatotropní	12,4 %	STH	akromegalie, gigantismus
Kortikotropní	8,3 %	ACTH	Cushingova nemoc
Laktotropní	42,6 %	PRL	galaktorea, amenorea, infertilita, impotence, hypogonadizmus
Gonadotropní a KAA	26,2 %	FSH, LH	obvykle hormonálně asymptomatické
Tyreotropní	1,1 %	TSH	obvykle hormonálně asymptomatické, vzácně hypertyreóza

I u buněk afunkčních adenomů byla prokázána přítomnost buněčných složek jako je endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie, které jsou nezbytné pro tvorbu hormonů, avšak tyto hormony jsou buď klinicky neúčinné a nebo je jejich sekrece nevýznamná. Do této skupiny patří tiché kortikotropní adenomy a *null cell* adenomy, u kterých byla pomocí imunocytochemických metod prokázána přítomnost FSH a nebo LH [Kovacs et al. 2001].

Podrobnější rozčlenění pituitárních adenomů dle imunohistochemické a ultrastrukturální analýzy adenohypofyzárních tumorů se provádí podle následující WHO klasifikace z roku 2004 [De Lellis et al.2004].

Funkční, hormonálně aktivní adenomy:

Adenomy s nadprodukcí STH (10–20 % všech adenomů) s klinickými projevy akromegalie a méně častěji gigantizmu

- 1) Somatotropní adenom hustě granulovaný (7 %) - roste pomalu, expanzivní efekt
- 2) Somatotropní adenom řídko granulovaný (9 %) - typický agresivním růstem
- 3) Smíšený somato-laktotropní adenom - poruchy menstruace, snížené libido
- 4) Mammo-somatotropní adenom (6 %) - vylučuje dva hormony s účastí tří druhů buněk:
 - a) každý z obou hormonů se tvoří zvlášť ve zralých somatotropech a mammotropech,
 - b) oba hormony se tvoří společně v jediné, méně diferencované buňce (tzv. mammosomatotropu)
- 5) Acidofilní adenom z kmenových buněk (1 %) - hyperprolaktinémie bez stigmat akromegalie, expanzivní efekt, agresivní, recidivující z nezralých buněk, které jsou bihormonální (PRL+GH)

6) Plurihormonální somatotropní adenom – produkuje více hormonů, často bez hormonální klinické významnosti

Adenomy s nadprodukcí PRL (30 %) s klinickými projevy galaktorey a sexuálních poruch

7) Prolaktinom řídké granulovaný (28,6 %)

8) Prolaktinom hustě granulovaný (0,3 %) - bývají jaderné atypie, roste agresivněji než předchozí typ

Adenomy s nadprodukcí TSH s klinickými projevy hypertyreózy

9) Tyreotropní adenom je vzácný (0,5–1 %) - obvykle velký tumor s projevy invazivity

Adenomy s nadprodukcí ACTH (10 %) - podmiňují Cushingovu chorobu, event. Nelsonův syndrom:

10) Kortikotropní adenom hustě granulovaný - představuje bazofilní mikroadenom

11) Kortikotropní adenom řídké granulovaný - je vzácnější než předchozí typ, převážně makroadenom

12) „Tichý“ kortikotropní adenom bez klinického syndromu

Adenomy s nadprodukcí FSH a LH (9,8 %) - existuje pouze laboratorní průkaz hyperprodukce, nikoli znaky endokrinopatie. Projevuje se spíše symptomatologií z útlaku svým expanzivním růstem gigantických rozměrů. Gonadotropní adenom je typický svým angiotropním uspořádáním chromofóbních, a místy acidofilních buněk. Němé gonadotrofinomy reprezentují největší část afunkčních gigantických adenomů.

13) gonadotropní adenom

Nefunkční, hormonálně inaktivní adenomy:

Němé adenomy (subtypy 1–3) - příznačný je negativní nález hormonu v séru při pozitivní histochemické hormonální detekci. Imitují řídké granulované formy jednotlivých klinických funkčních typů. Často mají gonadotropní povahu, exprimují alfa-podjednotku a beta-podjednotku FSH a LH.

14) Adenomy z nulových buněk (12,4 %) - vyčleňují se negativní histochemickou detekcí hormonů. Většinou se vyskytují u starších jedinců, dosahují velkých rozměrů. Při onkocytární přeměně větší části buněk mohou mít povahu onkocytomu.

Neklasifikovatelné nádory:

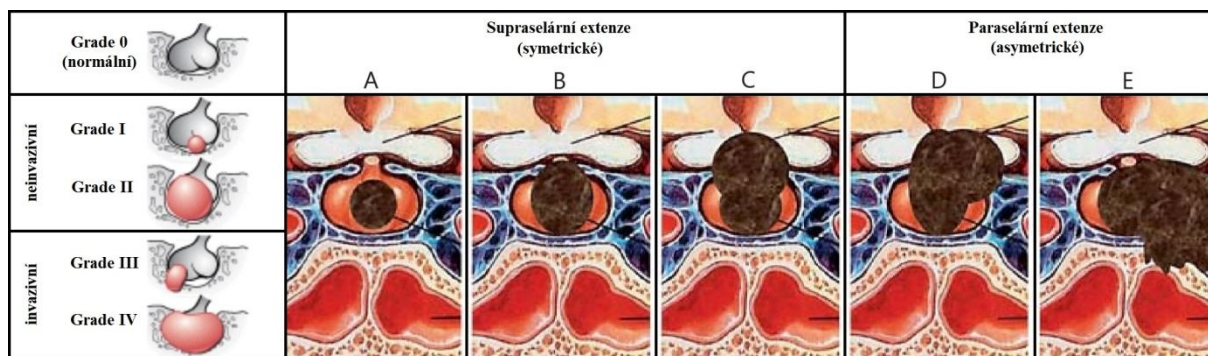
15) Neobvyklé plurihormonální adenomy - různé histologické obrazy neobvyklých kombinací. Častěji je pozorován agresivní růst s výskytem spíše u mladých jedinců a dětí. Mají sklon k invazivitě a jejich klinické příznaky závisí na druhu a intenzitě sekrece secernovaných hormonů.

2.1.1.3 Klasifikace založená na velikosti nádoru

Kromě hormonální produkce lze adenomy dělit na základě velikosti na mikroadenomy a makroadenomy. Mikroadenomy představují malá (<1 cm) většinou jen velmi pomalu rostoucí ložiska, která jsou lokalizována do oblasti *sella turcica* [Arafah et al. 2001]. V průběhu pětiletého sledování se zvětšují jen asi v 10 % [Daly et al. 2007]. Ložiska jsou typická spíše pro funkční adenomy. Pokud léze přesáhne alespoň v jednom ze svých rozměrů délku 1 cm, označuje se jako makroadenom. Pozvolný růst během 20–85 měsíců byl u nich pozorován v 7–51 % případů a častěji se objevuje i extraselární extenze [Dekkers et al. 2008]. Při pitvních nálezech představovaly makroadenomy pouze 0,4 % ve srovnání s mikroadenomy (> 99 %) [Molitch 2008].

2.1.1.4 Hardy-Wilsonova klasifikace založená na zobrazovacích technikách

Původní klasifikace nádorů hypofýzy vytvořená v roce 1969 Julesem Hardym a později modifikovaná Charlesem B. Wilsonem představuje výstižné a zároveň jednoduché rozčlenění nádorů hypofýzy na neinvazivní (grade I a grade II) a invazivní adenomy (grade III a grade IV) na základě známek kostní integrity spodiny sedla a kontinuity kavernózního sinu. Dalším hlediskem je extenze rostoucích adenomů do supraselárního prostoru, která je označována písmeny A, B a C při symetrickém šíření, písmenem D při asymetrickém supraselárním růstu a písmeno E označuje čistě paraselární extenzi [Abosch et al. 1998, Chatzellis et al. 2015]. Grafické znázornění viz obrázek 1.



Obrázek 1 Hardy-Wilsonova klasifikace pituitárních tumorů [Chatzellis et al. 2015]

Grade I: Mikroadenom < 1cm s lehce vyklenutou spodinou

Grade II: Makroadenom > 1 cm rozšiřuje sedlo, ale spodina zůstává intaktní

Grade III: Invazivní adenom částečně destruuující spodinu

Grade IV: Velmi invazivní adenom zcela destruuující spodinu

A: Intraselární lokalizace adenomu

B: Rozšíření adenomu supraselárně k spodině III. komory

C: Extenze adenomu až do přední části III. komory

D: Asymetrická paraselární extenze

E: Laterální expanze adenomu do oblasti kavernózního sinu

2.1.2 Epidemiologie adenomů hypofýzy

Adenomy hypofýzy představují přibližně 10–15 % všech nitrolebních nádorů, a vzhledem k faktu, že tvoří více než 90 % všech intraselárních afekcí [Dekkers et al. 2008, Abdelmannan et al. 2010, Chatzellis et al. 2015], řadí se k nejčastější nádorové lézi v oblasti tureckého sedla postihující převážně pacienty středního dospělého věku [Netuka et al. 2011]. Na základě informací získaných z Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) bylo zjištěno, že nádory hypofýzy se vyskytují u žen častěji než u mužů (1,12:1), a také častěji u afroamerické populace než kavkazské (1,81:1). Ve věku 15–34 let představují nejčastější nádory mozku a CNS [CBTRUS 2012].

Prevalence adenomů v České republice ani ve světě není přesně známa a její hodnoty se v různých studiích pohybují od 4,8 až do 94 / 100 000 obyvatel. Obdobně nejednotná data jsou publikována i pro incidenci, která se v průměru odhaduje na 3,9 / 100 000 / rok. Přehled prevalencí a incidencí je rozepsán v tabulce 4.

Tabulka 4 Přehled prevalencí a incidencí adenomů hypofýzy ve světě

Prevalence (100 000 osob)	Incidence (100 000 osob/rok)	autor
8,9	3,9	Percy et al. 1972
4,8	0,6	Guomundsson 1970
x	3,4	Lovaste et al. 1986
19,9	1,6	Faglia 1993
x	8,0	Ezzat et al. 2004
94,0	11,0	Daly et al. 2006
23,5	x	Davis et al. 2001
20,0	1,7	Netuka et al. 2011
52,0	x	Freda 2011
x	7,1	Abdelmannan et al. 2010
x	0,9	Surawicz et al. 1999
x	2,9	CBTRUS 2012
x	1,1	Nilsson et al. 2000
x	4,3	Monson 2000

Poznámka: symbolem "x" jsou označeny položky, u kterých nebyl údaj v citaci uveden.

Na základě dostupných epidemiologických dat je patrné, že v populaci dochází k pozvolnému zvyšování počtu diagnostikovaných adenomů [Daly et al. 2006]. Ve švédské studii provedené v letech 1958–1991 byl zaznamenán nárůst incidence z 0,6 případů na 1,1 / 100 000 / rok v průběhu 33 let [Nilsson et al. 2000]. Ke stejným závěrům dospěly studie CBTRUS z roku 1994 a 2008, ve kterých stoupl počet nově nahlášených nemocných z 0,9 na 2,92 / 100 000 / rok [Serawicz et al. 1999, CBTRUS 2012]. Rostoucí záchyt onemocnění může být důsledkem vyšší citlivosti nových zobrazovacích technologií jako je NMR nebo počítačová tomografie, a též citlivostí prováděných biochemických analýz [Arafah et al. 2001, Fernandez-Balsells et al. 2011, Abdelmannan et al. 2010]. Vzhledem k faktu, že se adenomy hypofýzy vyskytují zejména v 6. dekádě života, může být další možnou příčinou stoupající průměrný věk populace.

Hodnota prevalence je ovlivněna také tím, zda posuzujeme klinicky signifikantní adenomy, které byly zachyceny u pacientů s typickými příznaky, nebo zda adenom představuje spíše náhodný nález. Mezi náhodně prokazovanými jsou většinou malé, klinicky nevýznamné,

adenomy, které nečiní svému nositeli žádné obtíže. Označují se jako incidentalomy [Marek et al. 2001, Fernandez-Balsells et al. 2011, Abdelmannan et al. 2010]. Incidentalomy jsou jako vedlejší patologický nález popisovány zhruba u 11 % provedených autopsií a u přibližně 16 % pacientů během vyšetření pomocí NMR nebo CT. Podrobněji jsou nálezy incidentalomů rozepsány v tabulce 5.

Tabulka 5 Frekvence záchytu incidentalomů na základě autopsie a zobrazovacích technik

Frekvence záchytu (%)		autor
autopsie	CT/NMR	
22,5	x	Costello 1936
2,7	x	Hardy 1962
9,1	x	McCormick et al. 1971
9,5	x	Schwesinger et al. 1982
3,2	x	Uei et al. 1994
14,4	22,5	Ezzat et al. 2004
22,5	15,0	Scangas et al. 2014
10,0	x	Arafah et al. 2001
10,6	18,0	Freda et al. 2011
10,0	10,6	Abdelmannan et al. 2010
27,0	x	Gorczyca et al. 1988

2.1.3 Patofyziologie hypofyzárních adenomů

Hypofýza představuje centrální endokrinní žlázu, která je do velké míry nadřazena ostatním žlázám s vnitřní sekrecí. Prostřednictvím produkce různých peptidových hormonů působících na cílové orgány (nadledviny, štítná žláza, pohlavní žlázy, kosti, játra, atd.) hraje klíčovou roli v regulaci celé řady fyziologických procesů a udržení homeostázy. Z tohoto důvodu je nezbytné zachování neustálé plasticity adenohipofýzy, která se projevuje změnou v počtu buněk [Melmed 2003]. Proliferační a apoptotická aktivita hypofyzárních buněk je pečlivě regulována a udržována v rovnováze prostřednictvím autokrinních a parakrinních aktivačních a inhibičních faktorů. Mimo tyto intercelulární podněty přichází do hypofýzy i značné množství centrálních a periferních signálů, na které musí reagovat a přizpůsobovat se různým fyziologickým požadavkům. Tyto signály nemodelují pouze

produkci hormonů, ale také reverzibilní změny v růstu a počtu hypofyzárních buněk. Jakákoliv nerovnováha může vyústit v nekontrolovatelný nádorový proces [Perez-Castro et al. 2012]. Kromě změn v buněčném cyklu se na tomto procesu mohou podílet i poruchy v regulaci hormonů a jejich receptorů, dysbalance růstových faktorů a signálních proteinů [Ezzat et al. 2006].

Zjednodušeně by se procesy, které mohou vést ke vzniku adenomu, daly rozdělit do 4 oblastí:

A) Změny na úrovni hormonální regulace

Vnější patologické hormonální podněty mohou být příčinou hyperplázie nebo atrofie hypofýzy, proto zvýšená hormonální stimulace nebo poškození zpětnovazebného inhibičního procesu je považováno za jednu z možností tumorigeneze u hypofýzy [Asa 1991].

Příkladem může být ektopické zvýšení somatotropin stimulujícího hormonu (GHRH), který u pacientů vyvolává hyperplázii somatotropních buněk [Asa et al. 2002]. Podobný nález byl prokázán v průběhu těhotenství, kdy díky zvýšené hladině estrogenů dochází k hyperplázii laktotropních buněk a v případě prolaktinomu k jeho dalšímu růstu [Molitch 2003]. Poškození negativní zpětné vazby u dlouhotrvajícího primárního hypogonadizmu, hypotyreózy a nebo adrenální insuficienci opět vyvolá hyperplázii příslušných hypofyzárních buněk, která by mohla potencovat vznik adenomu [Ezzat et al. 2006]. Avšak samotná hyperstimulace hypofýzy nebývá primárním mechanismem při jeho vzniku.

B) Změny na úrovni receptorů

Mutace vedoucí ke konstitutivní aktivaci receptoru vázajícího hypotalamické liberiny zatím nebyla prokázána. Při testování na transgenních myších, které měly zablokovanou tvorbu receptoru pro prolaktin, byl zaznamenán časnější záchyt hyperplázie a detekovány mnohem větší a invazivnější prolaktinomy. Poruchy na úrovni receptoru vedou k narušení odpovědi na negativní zpětnou vazbu. Avšak mimo mutace u somatotropního řídce granulovaného adenomu nejsou běžné a hrají v patogenezi pouze minoritní roli [Ezzat et al. 2006].

C) Změny na úrovni růstových faktorů a jejich receptorů

Hypofýza a adenomy hypofýzy produkují široké spektrum růstových faktorů a jejich receptorů. U většiny z nich však nebyly prokázány významné změny

podílející se na tumorigenezi. Výjimku tvoří receptor-4 pro fibroblastový růstový faktor (FGF - fibroblast growth factor receptor), respektive jeho N-terminálně zkrácená varianta, která se vyskytuje zhruba u 40 % adenomů a projevuje se konstitutivní fosforylací i bez přítomnosti ligandu. Navíc bylo zjištěno, že ke vzniku adenomu dochází bez předchozí hyperplázie [Ezzat et al. 2002].

Rodina faktorů TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 3, aktivin, inhibin, BMP-4) jsou dalšími kandidáty, kteří se mohou podílet na vzniku adenomu hypofýzy. TGF- β 1 má inhibiční efekt na proliferaci buněk, zatímco TGF- β 3 efekt stimulační. Proto jejich nerovnováha indukovaná estrogeny ve prospěch TGF- β 3 přispívá ke vzniku prolaktinomů. Aktivin za normálních okolností vazbou na ALK4 receptor potlačuje růst hypofyzárních buněk. Pokud se však naváže na zkrácenou izoformu tohoto receptoru, svůj supresní účinek ztrácí. Tento jev byl pozorován hlavně u KAA [Perez-Castro et al. 2012].

D) Změny na úrovni signálních proteinů

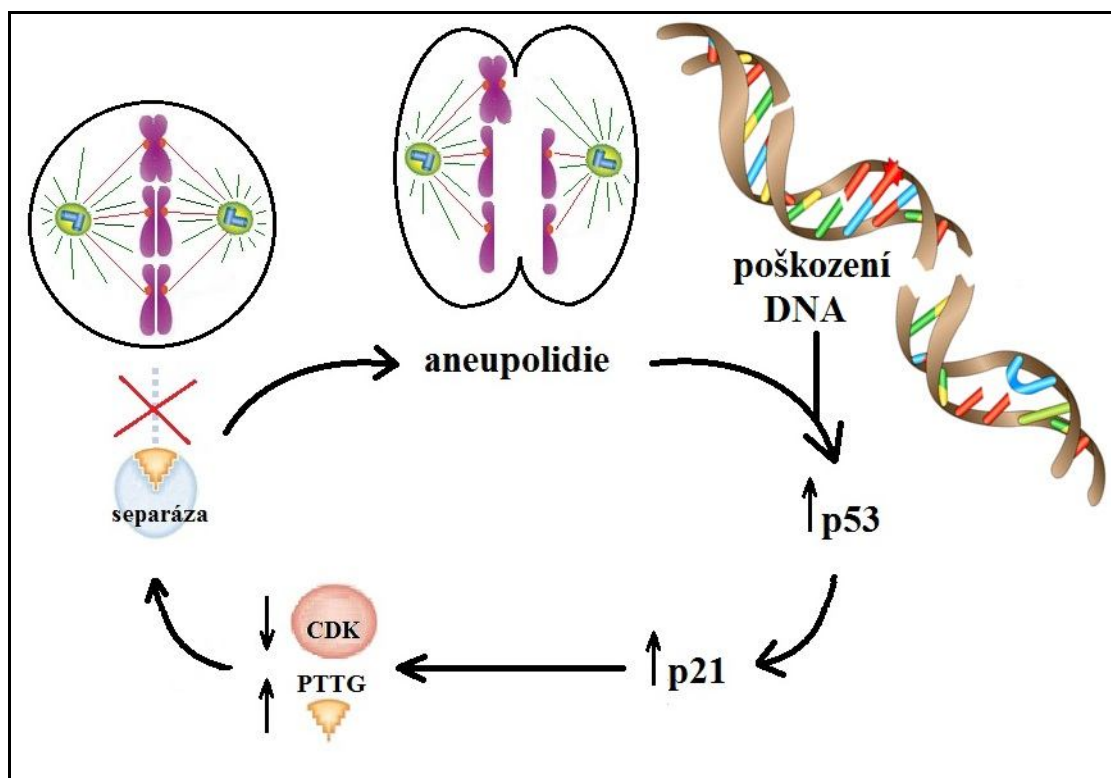
Důležitými regulačními proteiny, jež zprostředkovávají spojení mezi informační molekulou navázanou na membránový receptor a buněčným efektoem, představují G-proteiny. Byly popsány dvě bodové mutace v jejich α podjednotce (*GSP* gen), které znemožňují hydrolýzu aktivní formy GTP na inaktivní GDP. Výsledkem je konstitutivní přenos signálu stimulující produkci a sekreci růstového hormonu [Thapar et al. 2000]. Tyto mutace byly pozorovány u 40 % somatotropních adenomů, 10 % KAA a 5 % kortikotropních adenomů [Jagannathan et al. 2005].

E) Změny na úrovni buněčného cyklu

Buněčný cyklus je velmi dobře kontrolován řadou cyklinů a cyklin dependentních kináz (Cdk), včetně jejich inhibitorů [Perez-Castro et al. 2012]. U hypofyzárních nádorů byla zjištěna zvýšená hladina cyklinu D1 a E. Cyklin D1 byl zvýšeně exprimován u agresivních funkčních nádorů a KAA, zatímco cyklin E u kortikotropních adenomů [Jordan et al. 2000, Jagannathan et al. 2005]. Stejně tak snižená hladina klíčových inhibitorů Cdk, zejména proteinu p27^{Kip1}, vede ke vzniku kortikotropního adenomu [Roussel-Gervais et al. 2010].

Téměř všechny nádory hypofýzy zvýšeně exprimují transformační gen pro hypofyzární nádory (*PTTG* - pituitary tumor transforming gene), přičemž nejvyšší hladiny byly nalezeny u invazivních funkčních nádorů [Thapar et al. 2000]. Na základě toho je patrné, že gen *PTTG* stojí nejen za vznikem a progresí nádorů, ale

odráží i jejich invazivitu [Fong et al. 2012]. PTTG patří do rodiny sekurinů, jejichž hlavní úlohou je inhibovat aktivitu separáz, a tím vstup buněk do anafáze. Z tohoto důvodu je při nadbytku PTTG často pozorována aneuploidie, která spolu s chromozomální nestabilitou podněcuje tvorbu p21. Protein p21 tlumí činnost Cdk v G1 fázi a zastavuje tak buněčný cyklus. Aktivita p21 je stimulována pomocí proteinu p53, který reaguje na poškozenou DNA, a tím brání dalšímu růstu a maligní transformaci buněk, viz obrázek 2. [Chesnokova et al. 2010].



Obrázek 2 Změny na úrovni regulace buněčného cyklu. (Cdk - cyklin dependentní kináza, PTTG - pituitary tumor transforming gene)

2.1.4 Symptomatologie a diagnostika adenomů hypofýzy

Symptomatologie adenomů hypofýzy je velice široká a závisí na typu a lokalizaci nádoru. U klinicky funkčních adenomů, které představují převážně neinvazivní neexpandující mikroadenomy, je hlavním příznakem hypersekrece příslušného hormonu. KAA, u kterých hormonální nadprodukce chybí, často zůstávají němé dokud nedorostou do velikosti makroadenomu (>10 mm) a neprojeví se příznaky z útlaku okolních struktur [Netuka et al. 2011]. Se symptomatologií hypofyzárních adenomů úzce souvisí i jejich diagnostika, která se opírá o laboratorní stanovení hladin hormonů a vyšetření pomocí zobrazovacích technik.

2.1.4.1 GH–produkcující adenom

GH má mnohočetné biologické účinky, které vykonává přímo nebo nepřímo prostřednictvím tzv. inzulínu podobnému růstovému faktoru–1 (IGF–1), jehož produkci a sekreci v řadě buněk a orgánů podporuje. Kromě ovlivnění růstu a metabolismu základních živin má účinky i na nervový a kardiovaskulární systém. Nadbytek somatotropinu před uzavřením šterbin epifyzy vede k obřímu vzrůstu (gigantizmu) a po jejich uzavření se projevuje jako akromegalie. Pro toto onemocnění je typické zvětšování akrálních částí těla, ale existuje celá řada dalších příznaků, které se postupně vyvíjejí a stanovení správné diagnózy tak může trvat 10–15 let. Z praktického hlediska lze příznaky akromegalie rozdělit do dvou skupin: A) příznaky související s nadprodukcí růstového hormonu a B) příznaky související se zvětšujícím se nádorem v hypofýze.

[Netuka et al. 2011, Hána et al. 2013, Arafah et al. 2001]

A) Příznaky způsobené nadbytkem GH

- **zvětšení akrálních partií** – zmožutnění lícních kostí, supraorbitálních oblouků, mandibuly, uší, nadměrný růst rukou a nohou, ztluštění rtů, nosu a jazyka
- **muskuloskeletální příznaky** – růst a zvápenatění chrupavek a meziobratlových plotének, kyfoslóza, artróza velkých kloubů, artralgie, bolesti zad, myopatie
- **postižení kůže a podkoží** – ztluštění kůže (hlavně v oblasti vlasaté části hlavy), hypertrichóza, zmnožení podkožního vaziva, hypertrofie potních a mazových žláz, *acanthosis nigricans* (zdrsnění a ztluštění kůže, tmavá pigmentace a bradavičnaté výrůstky)
- **kardiovaskulární příznaky** – arteriální hypertenze, hypertrofie a fibróza myokardu, poruchy srdečního rytmu, předčasný rozvoj aterosklerózy a ischemické choroby srdeční
- **gastrointestinální příznaky** – hepatosplenomegalie, cholecystopatie, polypy tlustého stěva a kolorektální karcinom
- **metabolické příznaky** – inzulínová rezistence, porucha glukózové tolerance, hypercholesterolémie, hypertriacylglycerolémie, hyperfosfatémie, hyperkalciurie, retence sodíku a vody
- **endokrinní příznaky** – struma, hypopituitarizmus, hyperprolaktinnémie a s nimi spojené komplikace
- **respirační příznaky** – obstrukce horních cest dýchacích, porucha ventilace a spánkové apnoe

- **neurologické příznaky** – bolesti hlavy, změny nálady, slabost, unavenost, v důsledku útlaku *nervus mediannus* se rozvíjí syndrom karpálních tunelů

B) Příznaky způsobené rostoucím nádorem

U přibližně 60–80 % pacientů adenom doroste do velikosti makroadenomu a mimo příznaků z hypersekrece se projeví i příznaky útlakové. Ty jsou stejné pro všechny makroadenomy a budou popsány v odstavci u KAA této kapitoly.

[Arafah et al. 2001, Fryšák et al. 2009, Ezzat et al. 1994, Kršek 2011]

Diagnostika akromegalie

Diagnostika akromegalie úzce souvisí s jejím výše popsaným klinickým obrazem. Základem je změření hladiny GH v krvi. V úvahu se však musí brát cirkadiánní variabilita GH, a proto je daleko přesnějším ukazatelem výsledku glukózový toleranční test, který by měl navodit snížení hladiny GH. U zdravých osob je sekrece GH po zatížení glukózou suprimována, což neplatí pro autonomní produkci GH adenomem. Odběry by se měly provádět v čase 0, 30, 60, 90, 120 a 180 minut. Další důležitý marker představuje IGF–1, jehož sekrece je během dne stabilní a koreluje s hladinou GH. Pro úplnost a vyloučení hypopituitarizmu je vhodné vyšetřit i ostatní hypofyzární hormony.

Pro stanovení velikosti a přesné lokalizace nádoru se používá NMR, která dokáže zobrazit i velmi malý mikroadenom do velikosti cca 2–3 mm, a lépe tak určí vztah hypofyzárního adenomu k okolním strukturám. V případě supraselární extenze a útlaku zřakového nervu, je doporučeno neurooftalmologické vyšetření zraku a očního pozadí.

Výše popsaná vyšetření je vhodné doplnit o rentgen hrudníku a kloubů, EKG a stanovení hladiny glukózy v krvi.

[Arafah et al. 2001, Partsch et al. 2005, Fryšák et al. 2009, Hána 2013]

2.1.4.2 ACTH–produkující adenom

ACTH hypofýzy ovlivňuje vylučování kortizolu nadledvinami a jeho zvýšená hladina je příčinou hyperkortizolizmu zhruba v 70 % případů. Mikroadenom, který produkuje ACTH, jen vzácně přeroste velikost 1 cm, a tak se ve většině případů nadprodukce ACTH projeví hypersekrečním syndromem jako Cushingova choroba. Vyjádření klinického obrazu je dáno délkou a intenzitou expozice organismu nadměrným koncentracím kortizolu.

[Arafah et al. 2001, Netuka et al. 2011, Hána 2013]

A) Příznaky způsobené nadbytkem kortizolu

- **poruchy metabolismu lipidů** – změna lipidového spektra (vzestup hladiny celkového i LDL-cholesterolu a triacylglycerolů a pokles HDL-cholesterolu), vzestup hmotnosti s centrálním ukládáním viscerálního tuku především intraabdominálně, dále pak v oblasti tváří (měsícovitý obličej) a okolí krční páteře (tukový hrbol na krku), v supraklavikulárních oblastech, v mediastinu nebo epidurálně v páteřním kanálu (s možnými neurologickými projevy); v oblasti končetin podkožní tuk naopak mizí („pavoučí“ typ obezity)
- **poruchy metabolismu bílkovin** – jsou způsobeny proteokatabolickým a antianabolickým účinkem kortizolu projevujícím se muskulární atrofii s úbytkem zejména pletencových svalů vedoucí až k rozvoji steroidní myopatie se svalovými bolestmi a slabostí
- **poruchy metabolismu sacharidů** – narušení glukózové tolerance s rozvojem diabetu mellitu s výraznou inzulínovou rezistencí (tzv. steroidní diabetes)
- **postižení kůže** – kůže je ztenčená, křehká a již při minimálním traumatu se vytvářejí hematomy (zejména na předloktích a hřbetu rukou), objevují se purpurové strie dosahující šířky až 1 cm, převážně abdominálně, ale i na prsou, stehnech či lýtkách; dalším znakem je plethora obličeje, zvýšená fragilita cév, známky hirsutizmu, akné, alopecie (u žen), zhoršené hojení ran, zvýšená frekvence bakteriálních kožních infekcí a otoky dolních končetin
- **skeletální změny** – jsou dány působením kortizolu na kostní tkáň (snižuje proliferaci osteoblastů a aktivuje osteoresorpci) a kalciofosfátový metabolismus (snížená resorpce vápníku), postižen je celý kosterní systém, časté jsou bolesti zad, které obvykle souvisí s rozvojem osteopenie a osteoporózy vedoucí až k patologickým frakturám
- **endokrinní příznaky** – mineralokortikoidní účinek se projevuje hypernatrémií a hypervolémií vedoucí k arteriální hypertenzi, u žen se objevuje porucha menstruačního cyklu až amenorea, anovulace a infertilita, u mužů snížení libida
- **neurologické příznaky** – psychické změny se projevují emoční labilitou, depresemi, afektivní poruchou chování, celkovou unaveností, výpadky paměti, a poruchami koncentrace

B) Příznaky způsobené rostoucím nádorem

Makroadenomy se u Cushingovy choroby vyskytují jen zřídka, a proto příznaky z útlaku jsou spíše vzácností.

[Hána 2013, Kršek 2013, Isidori et al. 2015, Pivonell et al. 2015, Feelders et al. 2013]

Diagnostika Cushingovy choroby

Cushingova choroba se vyskytuje zejména u mladších osob do 30 let, kteří představují 30 % všech pacientů s tímto onemocněním. U žen je zaznamenán 6 krát častější záchyt ve srovnání s muži [Hána et al. 2013b].

Prvním stupněm v diagnostice Cushingovy choroby je laboratorní průkaz nadprodukce kortizolu. Vzhledem k diurnálnímu charakteru sekrece s maximem brzy ráno a s nočním minimem, je vhodnější vyšetřit celodenní profil plazmatické koncentrace a nebo noční odběr ve 24 hod. Vyšetření ze slin méně ovlivňuje zvýšení hladiny kortizolu způsobené stresem z odběru. Vyšetření krve je vhodné doplnit volným močovým kortizolem za 24 hodin. U Cushingovy choroby bývá zvýšen nad čtyřnásobek horní hranice normálních hodnot.

Velice spolehlivý diagnostický marker představuje supresní test s nízkou dávkou dexametazonu, který se provádí ve dvou variantách. V první se dexametazon podá ve 23 hod a následující den v 8 hod ráno je odebrána krev, ve druhém případě je pacientovi dexametazon podáván v šestihodinových intervalech (12–18–24–06 hod.) a hladina plazmatického kortizolu je vyšetřena 2 hodiny po podání poslední tablety. Obdobně lze použít vysokodávkový dexametazonový supresní test. V obou případech svědčí pokles koncentrace plazmatického kortizolu pod 50 % jeho bazální hodnoty pro centrální, tj. hypofyzární etiologii, stejně jako zvýšená bazální ranní hladina ACTH v plazmě.

K potvrzení ACTH secernujícího adenomu se používá NMR mozku se zaměřením na hypofýzu. U Cushingovy choroby jsou adenomy hypofýzy velmi malé a v 30 % případů nemusí být pomocí NMR odhaleny. V těchto případech se provádí katetrizace dolních petrózních splavů, aby se odlišila hypofyzární a paraneoplastické nadprodukce ACTH při malobuněčném karcinomu plic nebo karcinomu brzlíku. Pro nadprodukcí ACTH hypofyzárním tumorem svědčí zvýšené centrální hodnoty ACTH vůči periferním.

[Marek et al. 2001, Hána 2013, Kršek 2013, Partsch et al. 2005, Newell-Price et al. 2007, Daniel et al. 2015]

2.1.4.3 PRL–produkcující adenom

PRL se nejvíce uplatňuje v reprodukčním systému mužů a žen a jeho fyziologická hladina je nezbytná pro správnou funkci pohlavních orgánů. Má inhibiční vliv na sekreci

gonadotropních hormonů, adrenálních androgenů a způsobuje zánik žlutého tělíska. Je však nezbytný pro vývoj mléčné žlázy a jeho hlavní úlohou v organismu je zahájení a udržení tvorby mateřského mléka v průběhu těhotenství. Sekreci PRL reguluje hypotalamus, který jej prostřednictvím dopaminergních neuronů inhibuje a pomocí serotoninergních neuronů stimuluje. Během těhotenství dochází vlivem působení estrogenů k výraznému nárůstu koncentrace PRL. K patologickému zvýšení hladiny dochází v případě prolaktinomu (laktotropní adenom hypofýzy) nebo adenomu s kosekrecí GH a PRL. V tomto případě se kromě příznaků hyperprolaktinémie setkáváme i s příznaky akromegalie. Klinický obraz se liší u žen v produktivním věku, žen postmenopauzálních a u mužů.

[Arafah et al. 2001, Netuka et al. 2011, Hána 2013, Kršek 2002, Marek 2008]

A) Příznaky způsobené nadbytkem PRL

- **u žen v produktivním věku** – zahrnují hlavně poruchy menstruačního cyklu (oligomenorea až amenorea, infertilita při anovulačních cyklech, vzácně i hypermenorea (jako následek zkrácené luteální fáze), častější výskyt potratů, napětí v prsou a galaktorea (od mírné sekrece po mechanické stimulaci až po sekreci spontánní); dlouhodobě trvající hypoestrinismus může být příčinou dyspareunie (při snížené vaginální sekreci) a sníženého libida především díky nižším hladinám estrogenů, které mohou vést k poklesu obsahu minerálů v kostech a způsobit tak osteopenii až osteoporózu, v důsledku nižšího poměru koncentrací estrogenů a androgenů se objevuje hirzutismus a seborea
- **u postmenopauzálních žen** – příznaky jsou chudší a méně nápadné, neboť chybí poruchy menstruačního cyklu, které jsou pro hyperprolaktinémii typické, mohou se však objevit méně specifické symptomy jako je nárůst hmotnosti, retence tekutin nebo psychické změny (emoční labilita, úzkost, unavenost)
- **u mužů** – nejčastějším projevem je progredující ztráta libida a potence, snížení objemu ejakulátu a někdy také oligozoospermie, infertilita (tyto příznaky však nejsou výrazné a proto většina mikroprolaktinomů u mužů uniká diagnostice), hyperplázie prostaty, galaktorea nebo gynekomastie bývají přítomny méně často, v důsledku hypogonadizmu dochází k úbytku androgenního ochlupení, zpomalení růstu vousů, svalové hypotrofii a zmnožení abdominálního tuku

B) Příznaky způsobené rostoucím nádorem

Hypersekreční příznaky u postmenopauzálních žen a u mužů nejsou tak výrazné a proto jsou většinou zachyceny až ve stádiu makroadenomu v pozdějším věku. Ty jsou většinou agresivněji rostoucí a dosahují větších rozměrů v porovnání se ženami ve fertilním věku. Jednotlivé příznaky z útlaku jsou popsány u KAA.

[Walsh et al. 1997, Marek 2008, Kršek 2002]

Diagnostika hyperprolaktinémie

Prolaktinomy častěji postihují ženy ve fertilním věku, a to v poměru 10:1 vzhledem k mužům. Od 50. roku života se tento poměr srovnává. [Marek et al. 2001, Arafah et al. 2001] U pacientů s klinickým podezřením na hyperprolaktinémii se stanovuje sérový prolaktin při ranním odběru krve nalačno (minimálně 1–2 hodiny po probuzení). Vzhledem k epizodické sekreci prolaktinu a k její ovlivnitelnosti řadou faktorů je vhodnější u mírně zvýšených hodnot vycházet z průměru několika měření (nejčastěji se provádí tři odběry v půlhodinových intervalech). Stimulační testy nejsou v diferenciální diagnostice hyperprolaktinémie přínosné. K vyloučení hyperprolaktinémie způsobené periferní hypotyreózou se vyšetření doplňuje o stanovení hormonů štítné žlázy (tyroxinu T4 a trijódtyroninu T3) a TSH. U makroprolaktinomů je z důvodu vyloučení hypersekrece více hormonů nebo hypopituitarizmu způsobeného útlakem zdravé tkáně vždy nezbytné vyšetřit sekreci všech hypofyzárních hormonů.

Biochemické vyšetření je vhodné doplnit o NMR z důvodu vyloučení pseudoprolaktinomu, který útlakem hypofyzární stopky tlumí sekreci dopaminu. CT je v případě drobných mikroprolaktinomů méně citlivé a mohlo by dojít k falešně negativnímu nálezu. Na druhou stranu lépe zobrazuje invaze do kostních struktur. Nevýhodou NMR je poněkud horší zobrazení měkkých tkání.

Dále je indikováno oftalmologické vyšetření pomocí perimetru a u dlouhotrvající hyperprolaktinémie nebo v případě hypogonadizmu je vhodné doplnit vyšetření kostním denzitometrem.

[Partsch et al. 2005, Kršek 2002, Marek 2008]

2.1.4.4 TSH–produkující adenom

TSH reguluje produkci hormonů T4 a T3 ve štítné žláze a prostřednictvím nich hraje jednu z hlavních rolí v řízení metabolismu lipidů, proteinů a sacharidů. Kromě toho ovlivňují energetický metabolismus, srdeční činnost, resorpci kostní tkáně, funkci CNS a intrauterinní vývoj mozku plodu.

TSH–produkující hypofyzární tumory jsou vzácné a způsobují sekundární neboli centrální tyreotoxikózu. Příznaky jsou téměř stejné jako u tyreotoxikózy jiné etiologie, jen mívají mírnější průběh. Proto je při zjištění hypertyreózy důležité provést diferenciální diagnostiku za účelem zjištění jejího původu. Nadprodukce TSH může být spojena i s nadprodukcí jiných hypofyzárních hormonů, velmi často s GH či PRL.

[Hána 2013, Netuka et al. 2011, Jiskra 2011]

A) Příznaky způsobené nadbytkem TSH

- **poruchy metabolismu sacharidů** – narušení glukózové tolerance se projevuje zvýšenou glykogenolýzou a glukoneogenezí vedoucí k vzestupu glykémie (na druhou stranu, po přívodu glukózy dochází k jejímu rychlejšímu poklesu)
- **poruchy metabolismu lipidů** – v důsledku zvýšené lipolýzy dochází k rychlejšímu odbourávání cholesterolu vedoucímu ke ztrátám hmotnosti a hyperlipidacidémii
- **poruchy metabolismu bílkovin** – převažuje proteolýza s nárůstem tvorby a vylučováním močoviny a dochází k ubývání svalové hmoty a svalové slabosti
- **skeletální změny** – odbourávání základní kostní hmoty způsobuje osteoporózu, hyperkalcémii a hyperkalciurii
- **postižení kůže** – ta bývá jemná, často teple opocená, vlasy jsou nekvalitní, jemné a dochází k jejich řidnutí
- **poruchy kardiovaskulární** – zvýšením počtu receptorů pro katecholaminy v srdečním svalu ovlivňují sílu a tepovou frekvenci projevující se zrychlenou srdeční akcí, bušením srdce a srdeční arytmií (nejčastěji fibrilacemi síní); zvýšená potřeba kyslíku potencuje hyperventilaci a erytropoézu

B) Příznaky způsobené rostoucím nádorem

Vzhledem k tomu, že příznaky tyreotoxikózy způsobené adenomem hypofýzy jsou mírnější, mohou uniknout pozornosti lékaře. Proto TSH–secernující adenomy bývají častěji odhaleny až ve velikosti makroadenomů projevujícího se příznaky z útlaku.

[Brůnová 2008, Slaměník 2006]

Diagnostika hypertyreózy

K základnímu laboratornímu vyšetření patří stanovení hladiny TSH a volných frakcí hormonů štítné žlázy v krvi (volný tyroxin – fT4 a volný trijódtyronin – fT3). Na rozdíl od

primární tyreotoxikózy, u TSH–secernujícího adenomu nefunguje zpětnovazebná inhibice TSH a jeho hladina spolu s fT4 a fT3 je zvýšená. Hladiny protilátek proti tyreoglobulinu, tyreoidální peroxidáze a proti TSH receptorům jsou negativní. Pomocí supresního testu s T3, popř. kombinací T3 a T4, lze potvrdit centrální příčinu tyreotoxikózy. Pokud po podání nedochází k supresi TSH, poukazuje to na přítomnost tumoru hypofýzy. Dále je nutné morfologické vyšetření štítné žlázy, nejlépe sonograficky, neboť štítná žláza nevykazuje typické strukturální změny jako tomu je u Graves-Basedowovy choroby. Podezření na adenom hypofýzy potvrdí NMR. Z důvodu skeletálních změn by každý pacient s anamnézou tyreotoxikózy měl mít vyšetřenu kostní denzitu.

[Brúnová 2008, Slaměnik 2006, Jiskra 2011]

2.1.4.5 KAA

Pro KAA je charakteristická nepřítomnost hypofyzárních hormonů, avšak imunohistochemickými a elektronoptickými metodami je možné u 80–90 % z nich prokázat přítomnost sekrečních granul [Dekkers et al. 2008, Arafah et al. 2001]. Ve většině případů se jedná o gonadotropní adenomy s nálezem FSH, LH nebo jejich α podjednotky [Greenman et al. 2009a]. Hormony jsou však tvořeny v množstvích, které neovlivňují hladinu v krvi anebo jsou defektní, a tudíž fyziologicky neúčinné [Česák et al. 2009, Greenman et al. 2009a]. Proto se KAA neprojeví klinicky významnou hormonální nadprodukcí, a tedy nevytvářejí hypersekreční syndrom, jako je tomu u ostatních adenomů hypofýzy. Z tohoto důvodu jsou zřídka objeveny ve stádiu mikroadenomu, který je zcela lokalizován do oblasti tureckého sedla [Dekkers et al. 2008]. K jejich nálezu dochází většinou až v případě, kdy dorostou do velikosti makroadenomu a začnou se projevovat příznaky z útlaku okolních struktur. Nejčastěji se jedná o poruchu zraku (67,8 %), bolesti hlavy (41,4 %) a hypogonadismus (43,3 %) [Colao et al. 2008]. KAA tvoří až 80 % ze všech hypofyzárních makroadenomů [Dekkers et al. 2008].

B) Příznaky způsobené rostoucím nádorem

- **útlak zdravé hypofýzy** – může způsobovat poruchu sekrece jednoho nebo více hormonů adenohypofýzy (parciální hypopituitarismus) nebo všech hormonů (panhypopituitarismus), nejdříve dojde k poškození gonadotropní osy, později GH a nakonec TSH a ACTH produkce, naopak hladina PRL je zvýšená - jde o tzv. pseudoprolaktinom (příčinou je útlak stopky hypofýzy, a tím inhibice negativního vlivu dopaminu)

- **útlak hypotalamu** – může vést k poruchám termoregulace, chuti, příjmu potravy a pocitu žízně, diabetes insipidus, poruchy autonomního nervového systému, spánku a chování
- **tlak na *nervus opticus*** – zejména při supraselárním růstu způsobuje poruchy zorného pole a dochází k bitemporální nebo temporální kvadrantové hemianopsii a v nejtěžších případech ke ztrátě zraku
- **útlak okohybných nervů a *nervus vagus*** – dochází k tomu při paraselární propagaci do oblastí kavernózních sinů, čímž se poškodí jimi inervovaná oblast a projeví se ptózou, diplopií, oftalmoplegií a poruchami čítí v obličeji
- **tlak na temporální lalok** – může vyvolat temporální epilepsii
- **útlak centrálních struktur** –v případě extrémně velké expanze se projevuje jako hydrocefalus a vyvolává bolesti hlavy a psychické poruchy, poškození spodiny tureckého sedla způsobuje likvoreu

[Greenman et al. 2009a, Dekkers et al. 2008, Ferrante et al. 2006, Brochier et al. 2010]

Diagnostika KAA

Laboratorní vyšetření u KAA ve srovnání s klinicky funkčními adenomy nemá tak velkou výpovědní hodnotu, protože hormonální profil se může případ od případu lišit a projevovat se od parciálního hypopituitarizmu až po panhypopituitarizmus. Kromě snížených hladin hormonů se zejména u makroadenomů může vyskytnout zvýšená hladina PRL, na základě které by se místo KAA mohl chybně diagnostikovat prolaktinom. Naopak u makroprolaktinomu je nezbytné odhalit falešně nízký výsledek PRL způsobený tzv. „hook efektem“ a pro odlišení od KAA zopakovat měření s nařaděným vzorkem. Určení správné diagnózy je klíčové pro volbu terapeutického postupu a jeho výsledného efektu.

Pro definitivní průkaz KAA je nezbytné vyšetření hypofýzy pomocí NMR, které přesně odhalí rozsah selární léze, supraselární či paraselární růst včetně směru a typu, a případnou invazi do sousedních kavernózních sinů, což je velmi důležité znát před případnou operací. Z důvodu útlaku okolních struktur je vhodné provést neurooftamologické vyšetření.

[Netuka et al. 2011, Hána 2013, Dekkers et al. 2008]

2.1.5 Léčba adenomů hypofýzy

Mimo prolaktinomy je u adenomů hypofýzy primárně indikován neurochirurgický zákrok, který je nejčastěji prováděn transsfenoidálním přístupem za pomoci neuronavigace

[Dekkers et al. 2008]. Transkraniální přístup se používá jen v případě velkého supraselárně prorůstajícího tumoru, zejména pak u tumorů s výraznou asymetrií a s malou pravděpodobností kolapsu rezidua do sedla a u reoperací [Chandler et al. 2008, Česák et al. 2009]. Operace prováděná transkraniální cestou je ve srovnání s transnazální spojena s větším poškozením zdravé hypofýzy projevující se zhoršením její funkce (až u 15 % případů) a malým terapeutickým efektem [Nomikos et al. 2004].

U velkých adenomů, které se projevují příznaky z útlaku okolních struktur, je operace nejrychlejším řešením vedoucím k jejich odstranění. Po resekci nádoru, anebo alespoň jeho velké části, je zlepšení zrakových obtíží pozorováno až u 80 % pacientů, v řadě případů již první den po operaci. K úplné normalizaci zrakových funkcí dochází dokonce až v 30–50 % [Dekkers et al. 2008, Greenman et al. 2009b]. Po operaci ale, bohužel, přetrvává u značné části pacientů hypopituitarismus (deficit GH u 63–83 %, LH/FSH u 60–65 %, TSH u 52 % a ACTH u 30–46 %); ve srovnání se stavem před operací dochází ke zlepšení produkce LH/FSH hormonů [Dekkers et al. 2006, Brochier et al. 2010].

Úspěšnost operace je velmi variabilní a pohybuje se od 27–83 % v závislosti na velikosti a invazivním růstu nádoru, ale také na zkušenostech operačního týmu [Greenman et al. 2009a]. Mezi další rizikové faktory relapsu onemocnění se řadí: mladší věk, supraselární extenze a invaze do kavernózních sinů [Česák et al. 2009, Greenman et al. 2009b].

Operace přináší i svá rizika projevující se zhoršením zrakových funkcí (0,5–2,4 %), únikem cerebrospinální tekutiny (1,5–4,2 %), poškozením karotid (0,4–1,4 %), meningitidou (0,5–1,9 %). Perioperační mortalita se odhaduje na 0,2–1,2 % [Greenman et al. 2009b]. I po úspěšné operaci je nezbytné pacienta dlouhodobě sledovat, protože až u 18 % případů dochází během 5 let k rozvoji recidivy [Brochier et al. 2010].

K úplnému odstranění celého nádoru dochází jen v 54 % případů a často zůstává přítomno reziduum adenomu [Tabouada et al. 2007]. K opětovnému nárůstu nádorové masy dochází zhruba u 30–48 % pacientů během 5–10 let v závislosti na věku a následném použití radioterapie [Comtois et al. 1991, Gittoes et al. 1998]. Strmější růstové křivky byly pozorovány u pacientů mladších 61 let. Množství recidiv závisí také na radikalitě operačního výkonu, na počáteční velikosti a invazivitě adenomu [Česák et al. 2009].

Ani vlastní radioterapie nemusí být účinná u všech pacientů. I přes profylaktické použití byl pozorován růst rezidua u 18–36 % ozářených [Breen et al. 1998, Ferrante et al. 2006]. Její přínos v postoperativní péči je diskutován, zejména kvůli nežádoucím účinkům. Postradioterapeutický panhypopituitarismus se vyskytuje přibližně u 50 % pacientů, dále dochází k atrofii očního nervu a celkovému zhoršení zraku, a v neposlední řadě k

dvojnásobně vyššímu výskytu nádorů mozku v průběhu následujících 20 let [Dekkers et al. 2008, Greenman et al. 2009b, Brochier et al. 2010].

S nástupem radiochirurgie pomocí gama nože se v České republice od roku 1992 ustupuje od konvenční radioterapie a své uplatnění nachází jen u gigantických adenomů. Hlavní předností Leksellova gama nože je fokusované záření, které je kolimováno do úzkých svazků paprsků, čímž dojde k ozáření úzce vymezeného cíle. Mimo toto ohnisko dávka vyzářená do okolí strmě klesá [Minniti et al. 2007]. Úspěšnost radiochirurgie v případě zástavy růstu rezidua po operaci je u 90–100 % případů při délce sledování 2–4 roky [Dekkers et al. 2008, Sheenan et al. 2005] a u 89 % pacientů dochází ke zmenšení adenomu [Liscák et al. 2007]. Výskyt nežádoucích účinků je ve srovnání s klasickou radioterapií poměrně nízký. Hypopituitarismus se rozvíjí u 2–17 % pacientů, poškození zraku u 0,5–4 % a v 0,5 % případů dochází k lézi okohybných nervů. Rozvoj radionekrózy je zcela ojedinělý, a stejně tak nebylo prokázáno zvýšené riziko vzniku sekundárních tumorů [Netuka et al. 2011, Greenman et al. 2009b].

2.1.5.1 GH–produkující adenom

U GH–produkujícího adenomu se vyskytují zvětšené akrální části těla, avšak k tomuto jevu dochází pozvolna, proto akromegalie dlouho uniká klinické pozornosti. V České republice je na prvním místě léčebného postupu chirurgický zákrok [Marek et al. 2001]. Vzhledem k častému pozdnímu záchytu tohoto onemocnění je úspěšnost operace, která závisí především na velikosti, invazivitě a lokalizaci tumoru, zhruba 55–70 % u mikroadenomů a u makroadenomů okolo 40 % [Marek et al. 2001, Hána et al. 2013b]. Pokud se podaří nádor zcela vyoperovat, dochází k normalizaci hladin IGF–1 a GH zhruba do týdne a k návratu onemocnění dochází jen zřídka [Valdemarsson et al. 2000]. V případě prokázání rezidua po neúplné resekci se pokračuje nasazením medikamentózní léčby. U akromegalie jsou dopaminergní agonisté (DA) jen málo efektivní. Udává se, že k supresi GH dochází zhruba u 30 % a k normalizaci IGF–1 jen u 20 % [Hána et al. 2013b, Marek et al. 2001]. Vliv na zmenšení nádoru je jen minimální a vyšší efekt byl pozorován jen v případě mammosomatotropního adenomu [Colao et al. 2009, Fryšák et al. 2009]. Lepších výsledků bylo dosaženo užíváním dlouhodobě působících SA s účinností léčby okolo 50–70 % a s normalizací hodnot IGF–1 u 39–60 % pacientů [Marek et al. 2001, Netuka et al. 2011, Arafah et al. 2001, Colao et al. 2011]. Zmenšení nádorové masy bylo pozorováno u 21–62 % adenomů [Netuka et al. 2011, Arafah et al. 2001, Melmed 2008]. Rezistence na SA (oktreatid, lanreotid, pasireotid) se nevyskytuje příliš často (<10 %) a její míra koreluje s

počtem receptorů, přes které SA působí (hlavně SSTR2 a SSTR5) [Colao et al. 2011]. Ve většině případů stačí zvýšit dávku léčiva [Ferone et al. 2009]. U těchto rezistentních forem adenomů se osvědčilo podávat blokátor receptorů pro GH (pegvisomant), který normalizuje hladinu IGF-1 u 90 % léčených [Hána 2013]. Nežádoucí účinky farmakologické léčby se projevují gastrointestinálními obtížemi a u 30 % se vyskytuje cholecytolitiáza, pasireotid výrazně zvyšuje glykémii a v případě pegvisomantu dochází k nárůstu hladin jaterních transamináz [Arafah et al. 2001, Netuka et al. 2011].

Své uplatnění SA zaujímají před operací zejména expandujících nádorů, u kterých je možné pomocí nich docílit zmenšení léze, a tím zvýšit úspěšnost operace [Colao et al. 2009]. V případě rezidua po operaci slouží k inhibici jeho růstu a nebo v kombinaci s radiochirurgií k pokrytí doby do nástupu efektu ozářením [Hána 2013]. Tato doba představuje zhruba 42–66 měsíců [Jezkova et al. 2006].

2.1.5.2 ACTH–produkující adenom

Na rozdíl od prolaktinomů ACTH–produkující adenomy představují v 80–85 % poměrně malé mikroadenomy a Cushingova choroba se často klinicky projeví ještě dříve než je možné adenom spolehlivě diagnostikovat pomocí NMR [Netuka et al. 2011, Arafah et al. 2001]. Z tohoto důvodu bývá operace adenomu velmi náročná a masivní krvácení, které je dáno vysokým krevním tlakem typickým pro toto onemocnění, je dalším komplikujícím faktorem. Přesto se neurochirurgický zákrok volí jako první fáze léčebného postupu, přičemž úspěšnost operace se pohybuje mezi 50–70 % a recidiva se objevuje v 11,5 % případů [Hána 2013, Colao et al. 2009, Petersen et al. 2015, Isidori et al. 2015]. Po úplném odstranění nádoru dochází k rychlému poklesu ACTH a může se rozvinout hypokortizolizmus. Je proto vhodné po operaci sledovat hladiny ACTH a kortizolu, a v případě adrenální insuficience nebo nízké hladiny kortizolu substitučně podávat steroidní hormony (hydrokortizon) [Arafah et al. 2001]. Po neúspěšné operaci následuje ozáření rezidua Leksellovým gamanožem. Radiochirurgie přináší dobré výsledky v 63–73 % případů a recidivy se vyskytují v 11 % [Sheehan 2000]. K normalizaci hladin kortizolu po ozáření dochází u 84,3 % pacientů až po 4,5 letech, proto se do nástupu účinku radiochirurgie indikuje medikamentózní tlumení hyperkortizolizmu [Gabalec et al. 2014]. Ke snížení hladin ACTH se podávají SA nebo DA, ketokonazolem se nejčastěji inhibuje steroidogeneze, a mohou se přidávat i látky blokující receptory pro glukokortikoidy. Farmakologická léčba však není tak účinná jako u prolaktinomů a využívá se pouze jako léčba adjuvantní. Pasireotid působí přímo na ACTH produkující adenom a při podávání v

monoterapii snižuje hladinu volného močového kortizolu u 50 % a normalizuje u 29 % pacientů. Byl také zaznamenán pokles systolického tlaku o 6 mmHg a diastolického tlaku o 4 mmHg [Marek 2012, Isidori et al. 2015, Pivonello et al. 2014]. Léčba SA v monoterapii nebývá příliš účinná, protože vysoká hladina kortizolu snižuje expresi somatostatinových receptorů (SSTR), hlavně 2. typu. Z tohoto důvodu se ukázalo jako efektivnější jejich podání v kombinaci s ketokonazolem, který snižuje hladinu kortizolu, a tím zvyšuje účinek SA, anebo s DA, protože exprese dopaminového receptoru typu 2 (D2R) není ovlivněna hladinou kortizolu [Feelders et al. 2013]. Při léčbě kombinující pasireotid, kabergolin a ketokonazol došlo k normalizaci hladiny volného močového kortizolu u 88 % pacientů, k poklesu systolického a diastolického tlaku o 12 mmHg a 8 mmHg respektive, a ke snížení BMI a celkového cholesterolu [Marek 2012, Pivonello et al. 2014, Feelders et al. 2013]. Na hyperglykémii, která je jedním ze symptomů Cushingovy choroby, má léčba pasireotidem negativní vliv. Až ve 46 % případů, u kterých před zahájením terapie nebyla hyperglykémie prokázána, došlo v průběhu léčby k výraznému vzestupu glykémie. U 30 % se vyskytla také cholecytolitiáza [Pivonello et al. 2014]. Jen v krajních případech se indikuje bilaterální adrenalectomie, a to z důvodu rozvoje Nelsonova syndromu, který se objevuje až u 30 % pacientů [Netuka et al. 2011].

2.1.5.3 PRL–produkující adenom

Cílem léčby pacientů s prolaktinemií je normalizace hladiny PRL v krvi, odstranění klinických projevů a zmenšení, nebo lépe vymizení, PRL sekretujícího adenomu s minimálním dopadem na funkčnost hypofýzy. Léčebný postup u prolaktinomů se na rozdíl od ostatních adenomů hypofýzy zahajuje medikamentózní terapií, a to i v případě, že se jedná o makroadenom. Podávají se DA využívající inhibičního účinku dopaminu na syntézu a sekreci PRL v laktotropních buňkách prostřednictvím D2R [Gabalec et al. 2014]. Tato léčba se ukázala jako velmi účinná a k normalizaci hladin PRL dochází zhruba v 90 % mikroprolaktinomů a 70 % makroprolaktinomů [Colao et al. 2009], u zbylé části pacientů je pozorován alespoň pokles. Úplná rezistence na léčbu se vyskytuje jen zřídka a zahrnuje zhruba 10 % mikroprolaktinomů a 20 % makroprolaktinomů [Colao et al. 1997]. Zdá se, že rezistence nebo výsledný efekt léčby závisí na množství D2R exprimovaných na buňkách adenomu [Molitch 2005]. U nerezistentních prolaktinomů se díky této léčbě zastavuje růst nádoru a v případě makroprolaktinomů je pozorováno jejich zmenšení až u 80 % [Colao et al. 2009].

Nejlépe tolerovaný přípravek s nejvyšším účinkem a nejvhodnějším dávkováním představuje kabergolin [Marek 2001]. Ve studii porovnávající dva DA došlo u pacientů k normalizaci hladin PRL u 83 % v případě užívání kabergolinu a 59 % u bromokriptinu [Webster et al. 1994]. Přibližně po 2–3 měsících od zahájení terapie je vhodné zkontrolovat průběh a efekt léčby a řešit případné nežádoucí účinky [Arafah et al. 2001]. Mezi ty nejčastější patří zažívací obtíže (nauzea, zvracení, zácpa), závrať a ortostatická hypotenze. Celková délka terapie se odhaduje na 5–6 let. Pokud však u pacienta po tříměsíční léčbě nedochází ke zlepšení klinických příznaků, přistupuje se k chirurgickému odstranění adenomu. Transsfenoidální resekci nádoru se dosáhne okamžité normalizace hladiny PRL až u 90 % operovaných a po několika týdnech u nich dochází i ke zlepšení klinického stavu [Arafah et al. 2001]. U makroadenomů, zejména těch supraselárně expandujících, je chirurgický zákrok komplikovaný a k úplnému odstranění ložiska dochází jen asi v 50 % případů [Feigenbaum et al. 1995]. Po neúspěšné operaci nebo tam, kde je chirurgická léčba kontraindikována, následuje radiochirurgické ozařování [Kršek 2002].

Prognóza pacientů s prolaktinomem je ve většině případů velmi dobrá. U žen ve fertilním věku se obnoví menstruační a ovulační cyklus a mohou otěhotnět, u mužů se normalizuje hladina testosteronu, pohlavní funkce, libido a fertilita [Hána 2013].

2.1.5.4 TSH–produkující adenom

Tyto adenomy jsou velmi vzácné a ve většině případů dorůstají do velikosti makroadenomů, proto je základním a nejrychlejším způsobem jejich léčby chirurgický zákrok. Před operací je možné krátkodobě podávat tyreostatika k normalizaci funkce štítné žlázy [Hána 2013, Netuka et al. 2011]. V případě medikamentózní léčby, ať už před operací nebo po ní, se indikují SA, která vykazují poměrně dobrý efekt na hladinu TSH. Až u 75 % pacientů se docílí její normalizace a v 80–90 % dochází alespoň k jejímu snížení. Spolu s normalizací hladiny TSH byl v 95 % případů pozorován i pokles cirkulujících hormonů štítné žlázy pod jejich horní mez referenčního rozmezí [Arafah et al. 2001, Gabalec et al. 2014]. Vliv na velikost nádoru není tak výrazný a vyskytuje se zhruba u 30–50 % pacientů. Léčba pomocí DA není příliš účinná a navíc je nezbytné podávání vysokých dávek [Arafah et al. 2001, Colao et al. 2009].

2.1.5.5 KAA

KAA často bývají odhaleny náhodně pomocí NMR a nebo cíleně pokud se projevují příznaky z útlaku. V případě incidentalomů, pro které je typický pomalý růst, se indikuje

sledování pomocí NMR [Marek et al. 2001]. Frekvence kontrol závisí na velikosti adenomu v čase jeho diagnózy a první kontrolní snímek by měl být proveden zhruba po roce. Pokud nedochází ke zvětšení nádorové masy, indikuje se další kontrola za 2 roky a následně pak za 5 let [Marek et al. 2001]. Pokud je u pacienta objeven symptomatický makroadenom, který se projevuje zhoršením zraku a silnými bolestmi hlavy, na řadu přichází chirurgické odstranění léze. Úspěšnost operace je velmi variabilní a pohybuje se od 27–83 % v závislosti na velikosti a invazivním růstu nádoru [Greenman et al. 2009b]. Krátce po operaci dochází u 50–60 % pacientů ke zlepšení zraku a u 35–39 % k jeho normalizaci. Zlepšení hypofyzárních funkcí je pozorováno u 30 % osob, v 20 % dochází k jejich normalizaci a ve 49 % zůstávají hypofyzární funkce po operaci nezměněné [Greenman et al. 2009b].

Po chirurgickém zákroku je vhodné sledovat u pacienta stav zraku a funkčnost hypofýzy a zhruba kolem třetího měsíce po operaci by se měla provést kontrolní NMR, kde by již mělo být patrné, zda resekce byla kompletní [Kremer et al. 2002]. Případné reziduum, které vykazuje známky růstu, je ozářeno Leksellovým gama nožem [Netuka et al. 2011]. K recidivě onemocnění dochází přibližně u 17 % pacientů, u kterých nebylo prokázáno postoperační reziduum a u 46 % s přítomným reziduem. Proto je nezbytné pacienty dlouhodobě sledovat [Greenman et al. 2009b, Ferrante et al. 2004].

V České republice se zatím v případě KAA medikamentózní léčba pomocí SA ani DA neindikuje, ačkoliv již bylo publikováno několik prací poukazující na jejich pozitivní efekt ohledně inhibice růstu a zmenšení nádorové masy [Greenman et al. 2009b, Colao et al. 2009].

2.2 Somatostatin a somatostatinové receptory

2.2.1 Struktura somatostatinu

Historie objevů somatostatinu sahá až do roku 1967, kdy se poprvé v práci Krulich et al. [1968] objevila teorie o existenci dvou frakcí v hypotalamu, které antagonisticky ovlivňují sekreci hypofyzárního růstového hormonu (GH). O pět let později byl z extraktu ovčího hypotalamu vyizolován peptid, který specificky inhiboval *in vitro* sekreci lidského GH a byl pojmenován somatostatin (SST). Stejných účinků bylo dosaženo i při *in vivo* pokusech na krysách. Následně pak byla charakterizována primární aminokyselinová struktura

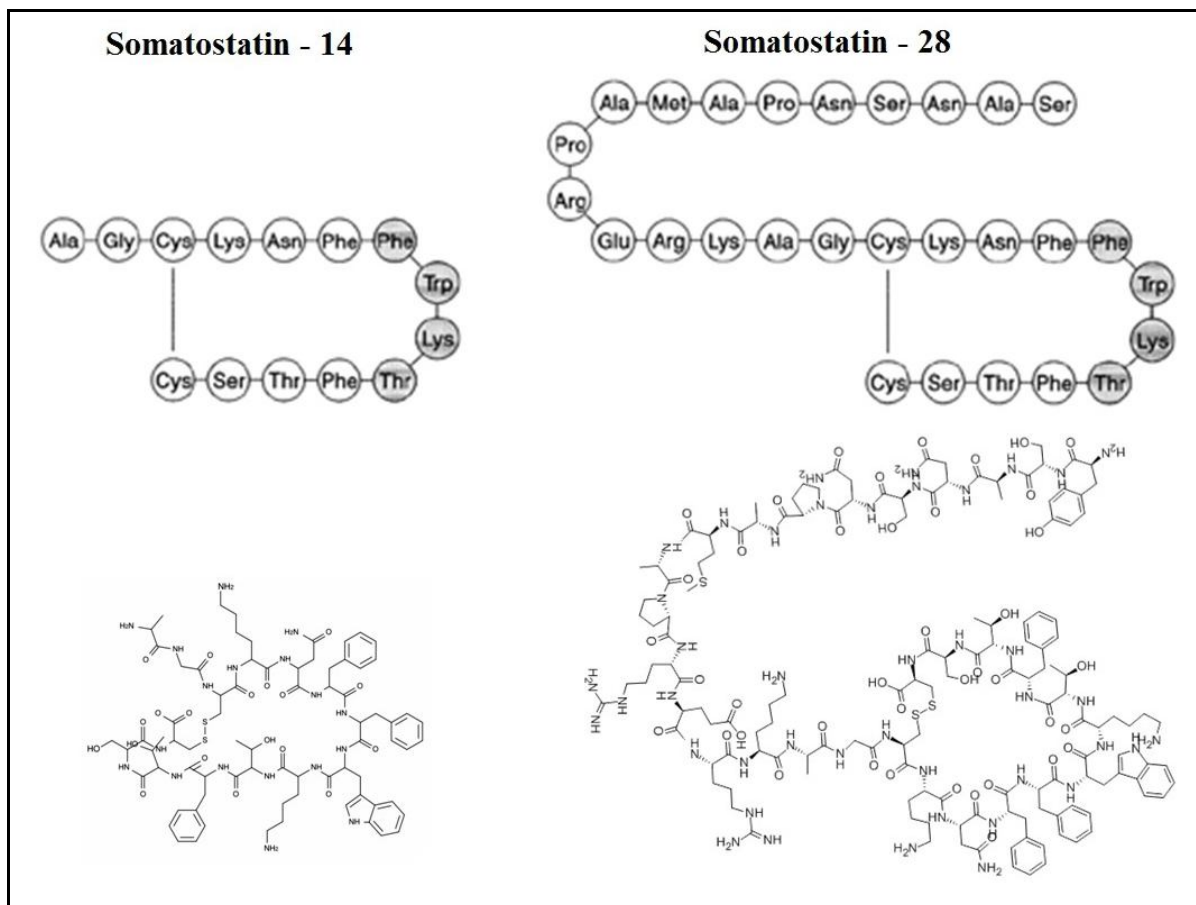
tohoto tetradekapeptidu (SST-14) [Burgus et al. 1973]. V roce 1980 byla identifikována delší forma SST o 28 aminokyselinách (SST-28) [Pradayrol et al. 1980].

Stejně jako ostatní hormony proteinové povahy, je i SST syntetizován nejprve v podobě preprosomatostatinového prekurzoru o 116 aminokyselinách s molekulovou hmotností 12 727 Da. Gen kódující tento prekurzor byl objeven na dlouhém raménku chromozomu 3 (3q28) v roce 1983 [Naylor et al. 1983, Zabel et al. 1983]. Homologie nukleotidových a aminokyselinových sekvencí SST mezi vybranými organizmy je znázorněna v tabulce 6.

Tabulka 6 Přehled homologií somatostatinu člověka s jinými organizmy [internetová databáze Genecards]

Organismus	Homologie aminokyselin	Homologie nukleotidů
šimpanz	99,14 %	99,71 %
pes	98,28 %	95,98 %
kráva	98,28 %	94,83 %
myš	96,55 %	90,52 %
krysa	96,55 %	90,23 %
kuře	87,93 %	82,18 %

Preprosomatostatinový prekurzor se skládá ze signálního peptidu (24 aminokyselin) spojeného s prohormonem (92 aminokyselin), na jehož C-terminálním konci se nachází vlastní sekvence, která je znázorněna na obrázku 3. Molekulové hmotnosti SST-14 a SST-28 jsou 1600 a 3000 Da. Zatím není jasné, zda SST-28 je obligátním prekurzorem SST-14 anebo je jejich vznik na sobě nezávislý [Shen et al. 1982]. Je však jisté, že se liší nejen svou specifickou tkáňovou distribucí, ale i produkovaným množstvím. SST-14 dominuje v hypofyzární portální krvi, v duodenu, pankreatu a je prakticky jedinou formou vyskytující se v retině, periferních nervech a enterické nervové soustavě (myenterická a submukózní pleteň). SST-28 je preferenčně syntetizován v cerebrospinálním moku, D-buňkách žaludku a tenkého střeva [Patel 1999a, Špičák 2012].



Obrázek 3 Aminokyselinová struktura somatostatinu 14 a 28.[Bokum et al. 2000]

Sekrece SST může být ovlivněna celou řadou látek zahrnující ionty, neuropeptidy, neurotransmitery, hormony, růstové faktory a cytokiny. Účinek těchto látek na hladinu SST se liší v závislosti na typu cílových buněk.

[Patel 1992, Patel et al. 1999b, Quintela et al. 1997a, Quintela et al. 1997b]

Uvolnění hormonu z D- buněk

- stimulováno: glukózou, aminokyselinami a lipidy
- inhibováno: inzulínem, opiáty, GABA

Uvolnění hormonu z hypotalamu

- stimulováno: GH, hormony štítné žlázy, IGF-1, IL-1, TNF- α a IL-6
- inhibováno: glukózou, leptinem, TGF- β

Glukokortikoidy vykazují dvojitý efekt na SST produkující buňky, který je závislý na dávce; nízká dávka stimuluje a vysoká inhibuje sekreci SST.

2.2.2 Funkce somatostatinu v organismu

Nejenže se SST vyskytuje téměř v celém organismu, ale zahrnuje i velmi široké pole účinků. Obecně jeho působením dochází ke snížení endokrinní a exokrinní sekrece, modulaci jiných neuropeptidů a neurotransmiterů, atd. K hlavním účinkům patří zejména inhibice produkce hypofyzárního GH a TSH. Vliv na hladinu prolaktinu a ACTH u zdravých jedinců není tak výrazný a v případě LH a FSH je jen minimální. Bylo však prokázáno, že u osob s nádorem produkujícím ACTH, u pacientů s Addisonovou chorobou nebo s prolaktinomem může také zvýšené hladiny příslušného hormonu potlačovat [Ben-Shlomo et al. 2010].

V gastrointestinálním traktu SST inhibuje uvolňování prakticky všech dosud známých hormonů a obecně snižuje exokrinní sekreci žaludeční a střevní šťávy a žluči. Oproti tomu prodlužuje průchod obsahu střevem, snižuje vylučování endogenní tekutiny do jejunu a posiluje absorpci vody a elektrolytů ze střeva. Uplatňuje se mimo jiné i při potlačování průjmů [Barnett 2003]. V rámci imunitního systému blokuje uvolňování růstových faktorů (IGF-1, EGF, PDGF), cytokinů (IL-6, IFN- γ) a proliferaci lymfatických a hemopoetických buněk [Blum et al. 1992, Elliott et al. 1998, Hayry et al. 1993]. Přehled podtypů SSTR, prostřednictvím kterých je sekrece jednotlivých hormonů inhibována, shrnuje tabulka 7.

Tabulka 7 Přehled hormonů a SSTR podtypů, přes které je zprostředkován antisekreční účinek somatostatinu. [Guillermet-Guibert et al. 2005b, Ben-Shlomo et al. 2010]

Hormon	Receptor
GH	SSTR1, <u>SSTR2</u> , SSTR5
TSH	SSTR2, SSTR5
ACTH	SSTR2, <u>SSTR5</u>
PRL	SSTR2*, SSTR3*, <u>SSTR5</u>
inzulín	SSTR2, SSTR5
glukagon	SSTR2
IFN- γ	SSTR2

Poznámka: Hlavní podtyp je v tabulce podtržen

* Exprese po stimulaci 17 β estradiolem

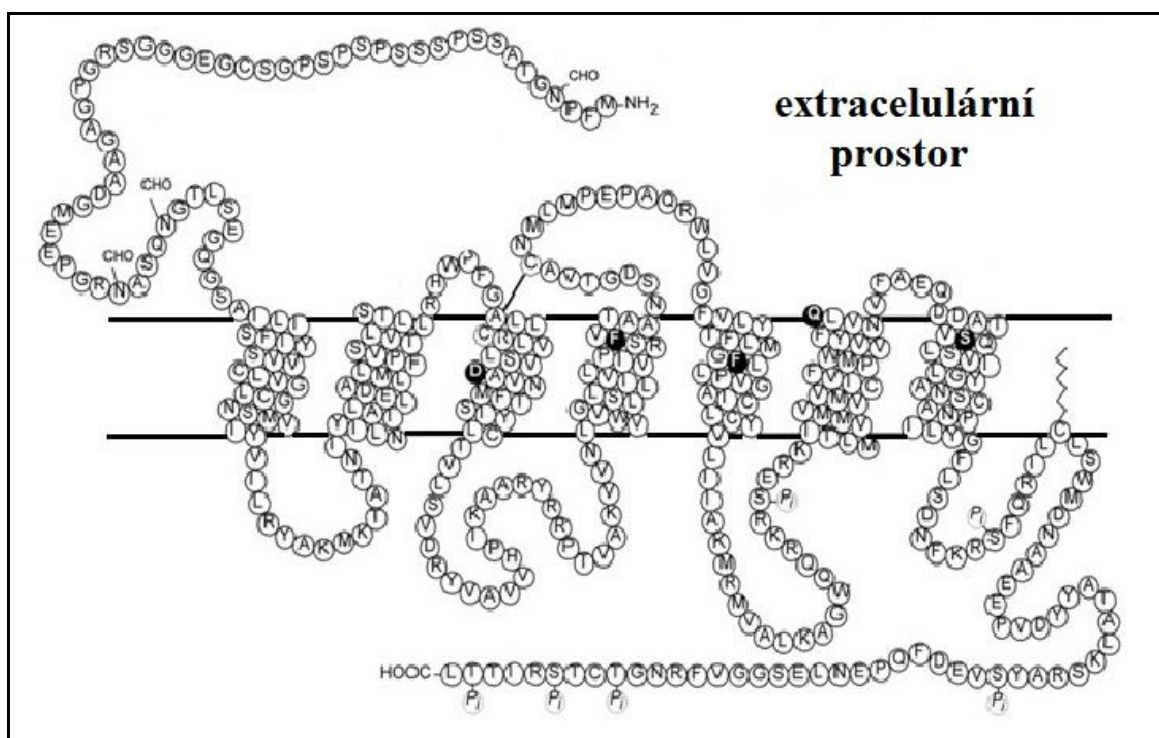
Kromě modulační úlohy v neurotransmisi a v kognitivních funkcích somatostatin ovlivňuje proliferaci normálních i nádorových buněk a je schopen spouštět apoptózu vnější cestou prostřednictvím tumor nekrosis faktoru α (TNF α) nebo vnitřní mitochondriální cestou

aktivací proapoptického Bcl-2 [Guillermet-Guibert et al. 2005b]. Mimo to SST vykazuje také antiangiogenetický účinek zprostředkovaný inhibicí sekrece angiogenních faktorů (HMEC–human dermal microvascular endothelial cells, VEGF–vascular endothelial growth factor, FGF2–fibroblast growth factor 2) [Susini et al. 2006, Bocci et al. 2007]. Antiproliferační účinek spolu s inhibicí angiogeneze se mohou podílet na zmenšování nádorové masy [Barnett 2003].

Všechny tyto výše zmíněné účinky SST jsou zprostředkovány pomocí proteinových membránových receptorů (SST receptor; SSTR), což bylo poprvé publikováno v roce 1978 na základě pokusů s radioaktivně značeným ^{125}I -SST na krysích nádorových buňkách hypofýzy (GH4C1) [Schonbrunn et al. 1978].

2.2.3 Struktura somatostatinových receptorů

V roce 1992 byla zveřejněna nukleotidová sekvence a primární struktura SSTR1 a SSTR2 a následně pak byly objeveny ještě další tři subtypy (SSTR3, SSTR4 a SSTR5) [Yamada et al. 1992]. Struktura SSTR1 je patrná na obrázku 4.

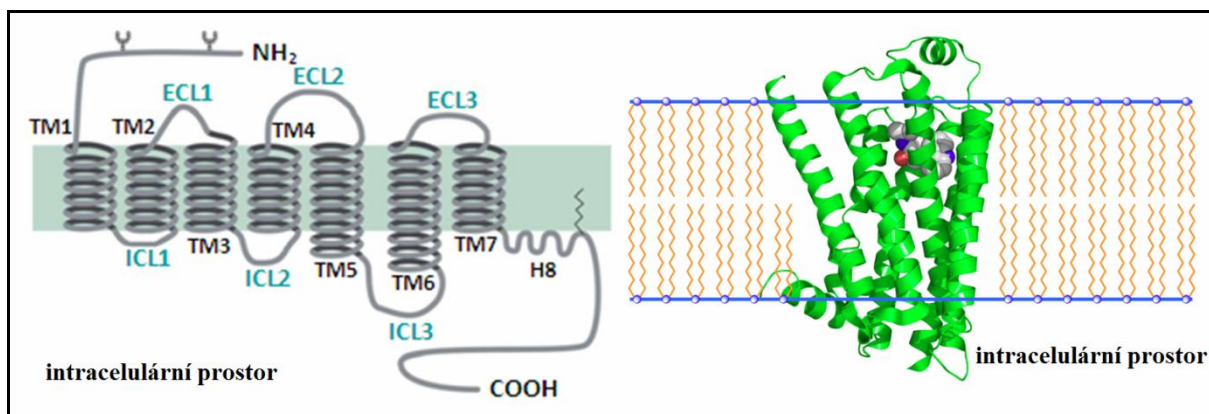


Obrázek 4 Struktura SSTR1 [Sheridan et al. 2000]

Geny kódující tyto receptory byly objeveny na různých chromozomech a jejich lokalizace byla upřesněna až po roce 1993 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) [Yamada et al. 1993, Yasuda et al. 1993, Takeda et al. 1995]. Chromozomální lokalizace SSTR1

genu je 14q13, *SSTR2* genu 17q24, *SSTR3* 22q13.1, *SSTR4* 20p11.2 a *SSTR5* 16p13.3 [Barnett 2003]. Mimo *SSTR2* všechny ostatní geny postrádají introny, díky kterým může *SSTR2* transkript podléhat alternativnímu sestřihu a produkovat dvě izoformy *SSTR2*, které se vzájemně liší délkou v C-terminální části proteinu [Patel 1997]. *SSTR2A* představuje o 23 aminokyselin delší formu a *SSTR2B* po sestřihu krátkou formu [Vanetti et al. 1992, Patel 1993].

Všech šest subtypů *SSTR* patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteinem, které mají typickou strukturu sedmi transmembránových α -helixových domén. Jednotlivé α -helixy jsou navzájem spojeny třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami (ECL1-ECL3, ICL1-ICL3), graficky znázorněno na obrázku 5.



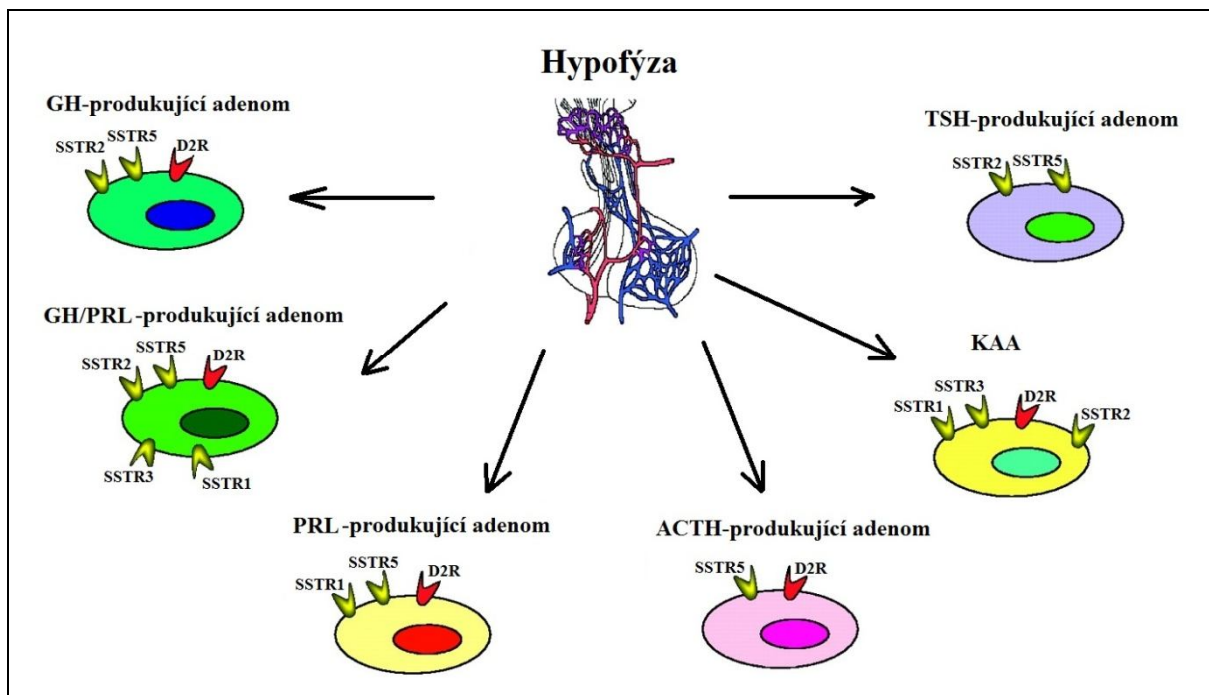
Obrázek 5 Struktura receptorů spřažených s G-proteinem. TM1-TM7 znázorňuje transmembránové domény, ICL1-ICL3 intracelulární smyčky a ECL1-ECL3 extracelulární smyčky. (Deupi et al. 2007)

Všechny receptory vykazují přibližně stejnou molekulovou hmotnost (363–418 kDa) a počet jejich aminokyselin se pohybuje mezi 346 (*SSTR2B*) a 418 (*SSTR3*). Strukturálně si jsou nejvíce podobné v transmembránové oblasti a liší se zejména v aminoterminální a karboxyterminální části. Nejvyšší vzájemnou homologii má *SSTR1* a *SSTR4* (63 %), a naopak nejnižší *SSTR1* a *SSTR3* (37 %) [Sheridan et al. 2000]. Vzájemná homologie jednotlivých lidských *SSTR* je uvedena v tabulce 8. Všechny subtypy *SSTR*, ať už lidského nebo jiného živočišného původu, obsahují vysoce konzervativní oblast v sedmé transmembránové doméně, která slouží jako charakteristický znak právě pro členy této rodiny [Patel 1995].

Tabulka 8 Homologie lidských SSTR. [Sheridan et al. 2000]

SSTR2a	44 %				
SSTR2b	45 %	93 %			
SSTR3	37 %	42 %	43 %		
SSTR4	63 %	46 %	49 %	41 %	
SSTR5	49 %	56 %	57 %	52 %	53 %
	SSTR1	SSTR2a	SSTR2b	SSTR3	SSTR4

Výskyt jednotlivých receptorových subtypů na povrchu buněk se liší nejen v různých tkáních, ale i mezi živočišnými druhy. V lidské zdravé tkáni jsou zastoupeny všechny subtypy SSTR, a to jak v centrálním nervovém systému, tak i mimo něj, zejména v gastrointestinálním traktu, dále pak v endokrinních a exokrinních žlázách, stejně jako v buňkách účastnících se zánětlivé reakce [Barnett 2003, Krantic et al. 2004]. Výjimku tvoří SSTR4, který se v hypofýze vyskytuje pouze ve fetálním období [Ben-Shlomo et al. 2010]. Kromě zdravé tkáně jsou SSTR hojně zastoupeny i na povrchu nádorových buněk, především hypofyzárních, pankreatických, prsních, nervových nebo hematopoetických. Ve většině nádorů je převážně exprimován SSTR2, druhým nejfrekventovanějším receptorem je SSTR1, následován SSTR3 a SSTR4. Výskyt jednotlivých SSTR na různých typech adenomů hypofýzy ukazuje obrázek 6. Expresse SSTR5 oproti ostatním receptorům se zdá být spíše nádorově specifická a vyskytuje se jen u některých typů [Patel 1997].

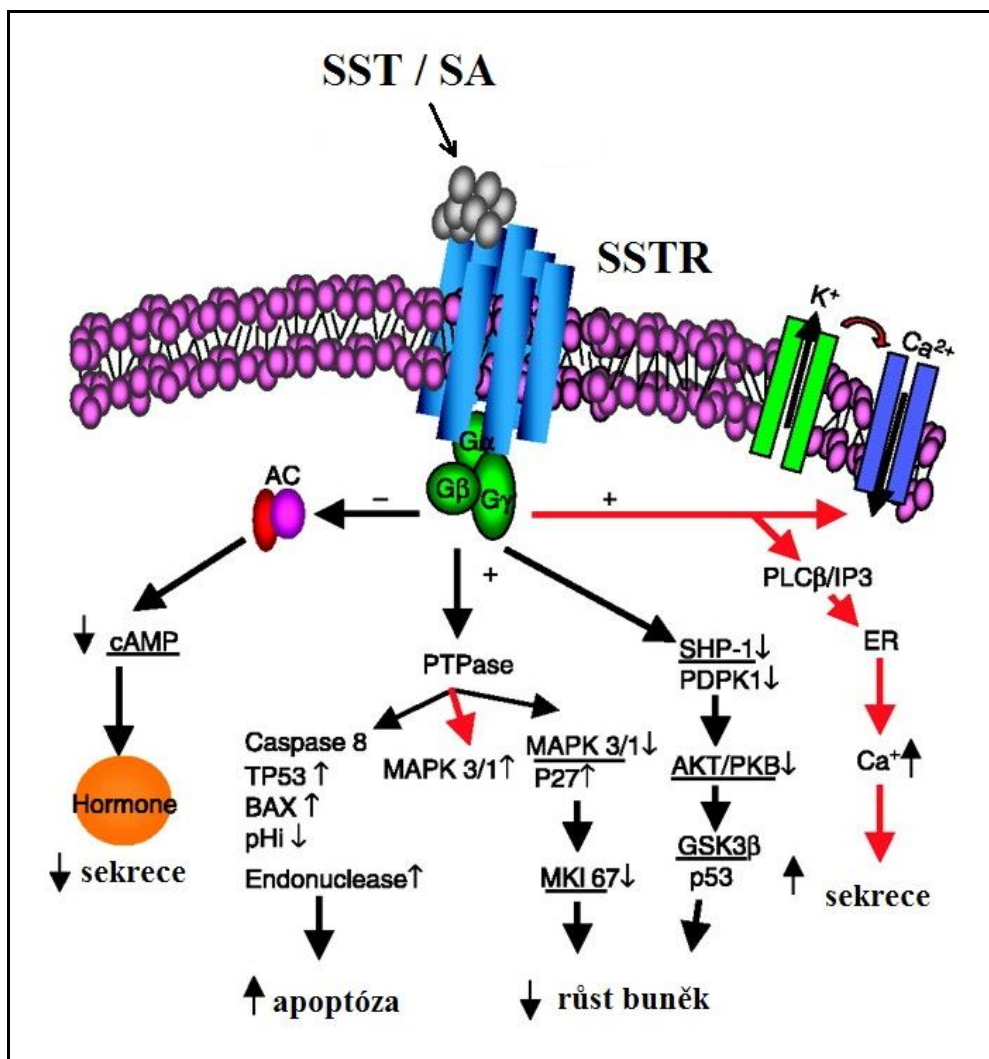


Obrázek 6 Přehled SSTR receptorů zastoupených na různých typech adenomů hypofýzy. Poznámka: D2R (dopaminový receptor typ 2) [Ferone et al. 2009]

2.2.4 Přenos signálu prostřednictvím SSTR

Přírodní SST-14 i SST-28 se na SSTR váží přibližně se stejnou afinitou, ačkoli to vypadá, že SST-28 vykazuje 10 krát vyšší afinitu k SSTR5 [Patel 1999a, Guillermet-Guibert et al. 2005a]. Z *in vitro* studií vyplývá, že výsledný účinek SST na buňku se liší dle typu receptoru, jeho lokalizace v organismu a způsobu přenosu signálu buňkou. Inhibiční efekt na nervový přenos, kognitivní funkce, hladkou svalovinu, sekreci, motilitu střev a absorpci živin a iontů je zprostředkován čtyřmi základními nitrobuněčnými cestami (obrázek 7) :

- 1) inhibicí adenylátcyklázy s následným poklesem nitrobuněčného cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP);
- 2) snížením hladiny Ca^{2+} , které je způsobeno zablokováním přísunu Ca^{2+} iontů do buňky prostřednictvím vápenatých kanálků;
- 3) aktivací fosfatáz (kalcineurin inhibuje exocytózu a serin/threonin fosfatáza ovlivňuje vápenaté a draselné kanálky);
- 4) prostřednictvím SSTR aktivací intracelulární tyrozinofosfatázy, která různými cestami vede k inhibici buněčné proliferace a k iniciaci apoptózy.



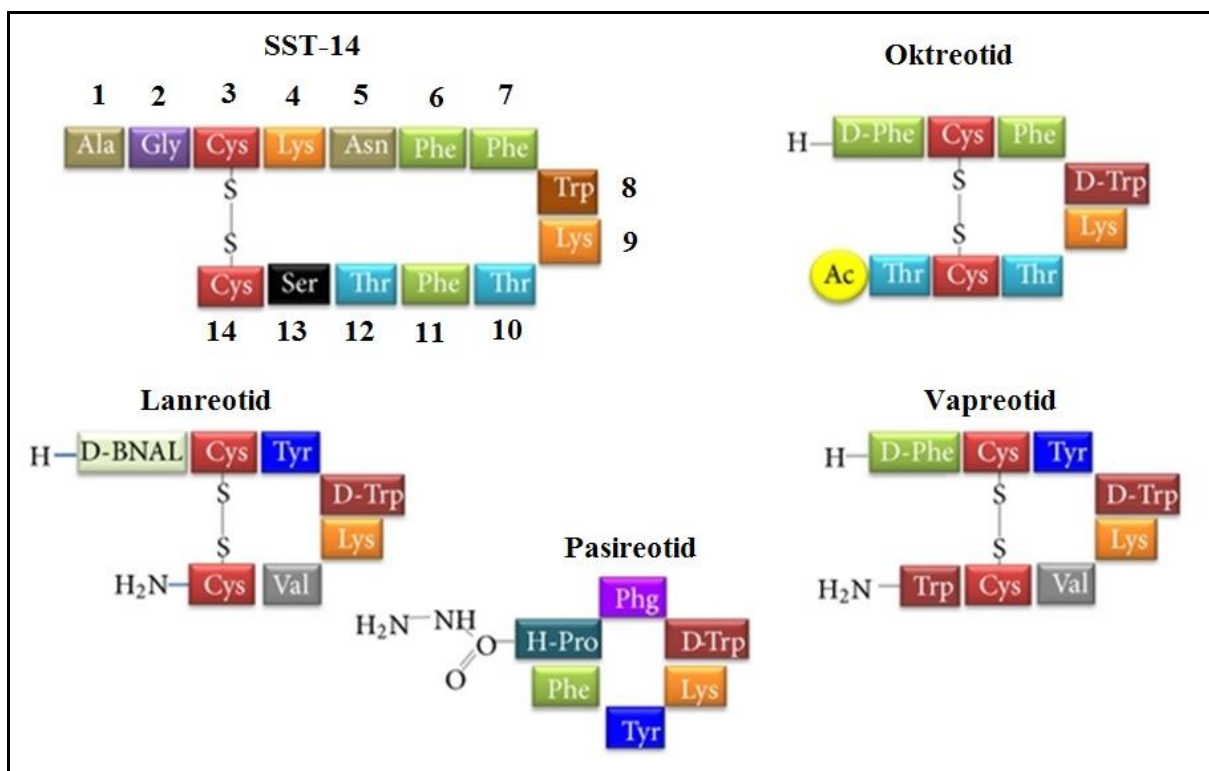
Obrázek 7 Základní cesty působení SST prostřednictvím SSTR [Ferone et al. 2009]

2.2.5 Somatostatinová analoga

Od doby, kdy byl objeven SST, byly synteticky vytvořeny stovky jeho analogických struktur. Vzhledem k velmi krátkému biologickému poločasů fyziologického SST, který je pouze 1–3 minuty, se začalo pracovat na výrobě somatostatinového analoga (SA) s vyšší stabilitou a účinností [Sheppard et al. 1979].

Jedním z prvních byl somatostatinový analog s tryptofanem v osmé pozici aminokyselinového řetězce (D-Trp⁸), který díky záměně L-aminokyseliny za D-formu vykazoval 6–8 krát vyšší účinek a stabilitu. Sérií dalších pokusů na úrovni primární struktury se zjistilo, že 4 aminokyseliny (Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹, Thr¹⁰) tvořící β ohyb, jsou nezbytné pro biologický účinek SST. Aminokyseliny Phe⁷ a Thr¹⁰ mohou být zaměněny za Tyr⁷ a Val/Ser¹⁰ bez významné změny na účinek, avšak přítomnost Trp a Lys v pozici 8 a 9 je esenciální.

V osmdesátých letech minulého století byla vytvořena první tzv. „krátká syntetická analoga“ SST (oktreotid, vapreotid, lanreotid, seglitid), které našly uplatnění v medicíně. Aminokyselinové sekvence vybraných SA jsou na obrázku 8. Všechny tyto cyklické oktapeptidy měly nejen vyšší účinnost, ale i rezistenci k peptidázám, díky čemuž se jejich biologický čas prodloužil na 1,5–2 hodiny [Janecka et al. 2001, Modlin et al. 2010].



Obrázek 8 Aminokyselinové sekvence vybraných SA a SST-14 [Barbieri et al. 2013]

2.2.5.1 Oktreotid

První analog, oktreotid (SMS201-995), byl zaveden do praxe v roce 1983 a používal se k léčbě klinicky funkčních neuroendokrinních nádorů hypofýzy, pankreatu a střev. Na jeho vývoji pracoval od roku 1975 Wilfried Bauer [Bauer et al. 1982]. Oktreotid vykazuje nejvyšší afinitu k SSTR2 a SSTR5, střední k SSTR3 a velmi nízkou k SSTR1 a SSTR4. Nevýhodou je jeho nekompletní absorpce po orálním užití, proto musel být podáván intravenózně nebo subkutánně. Po absorpci je z 65 % vázán na plazmatické bílkoviny a zhruba jedna třetina je v nezměněné formě vyloučena močí. Biologický poločas je po podkožní aplikaci zhruba 2 hodiny, proto bylo nutné aplikovat injekce dva až třikrát denně. Na základě klinických studií bylo zjištěno, že pulzní dávky aplikované několikrát denně mají nižší terapeutický efekt ve srovnání s infuzí, která zajišťovala přísun stálé hladiny SA.

Tyto poznatky byly podnětem pro vývoj nové formy oktreotidu, tzv. oktreotid LAR (long-acting depot formulation), který zvýšil nejen klinickou účinnost léčby, ale následně i kvalitu života díky poměrně mírným vedlejším účinkům. Pozvolné uvolňování léčiva je zajištěno pomocí inkorporace oktreotidu do mikrokuliček z biodegradativního polymeru. Díky pozvolnému uvolňování po intramuskulární aplikaci zůstává konstantní hladina oktreotidu po dobu 28–42 dnů, a proto stačí podávat 30–60 mg jednou za čtyři týdny [Modlin et al. 2010].

2.2.5.2 Lanreotid

Jedním z dalších klinicky užívaných SA je lanreotid. Jedná se také o oktapeptid, který stejně jako oktreotid má nejvyšší afinitu k SSTR2 a SSTR5, střední k SSTR3 a velmi nízkou k SSTR1 a SSTR4. Své uplatnění našel v léčbě neuroendokrinních nádorů a u pacientů s akromegalií. Od oktreotidu se liší primární strukturou v pozici 7. a 10. aminokyseliny, kde místo Phe⁷ a Thr¹⁰ má Tyr⁷ a Val¹⁰. Tento analog byl vyvinut ve dvou formách, lanreotid MP (microparticles) a lanreotid autogel. První z nich byl aplikován intramuskulárně se čtrnáctidenní periodou, ale postupně se začal nahrazovat lanreotid autogelem, který se podává injekčně jednou za 4 týdny [Modlin et al. 2010].

2.2.5.3 Pasireotid

Nejnovějším SA je pasireotid (SOM 230). Jedná se o cyklohexapeptid, který je složený z lyzinu, D-tryptofanu, fenyglycinu, aminoethylkarbamoylhydroxyprolinu, fenyalaninu a O-benzyltyrozinu. Pasireotid je rychle vstřebáván, maximální plazmatické koncentrace je dosaženo během 0,25–0,5 hodiny a jeho efektivní biologický poločas je u zdravých dobrovolníků přibližně 12 hodin. Distribuce mezi krevními buňkami a plazmou je nezávislá na koncentraci a ukazuje se, že pasireotid přetrvává především v plazmě (91 %). Vazba na plazmatické bílkoviny je 88 % a je nezávislá na koncentraci. Pasireotid je metabolicky vysoce stabilní a *in vitro* data prokazují, že není substrátem, inhibitorem ani induktorem žádného z hlavních enzymů CYP450. U zdravých dobrovolníků se pasireotid vyskytuje především v plazmě, moči a stolici, a to v nezměněné formě. Pasireotid je eliminován především prostřednictvím jaterní clearance (biliární exkrece) a jen malé množství se vylučuje ledvinami.

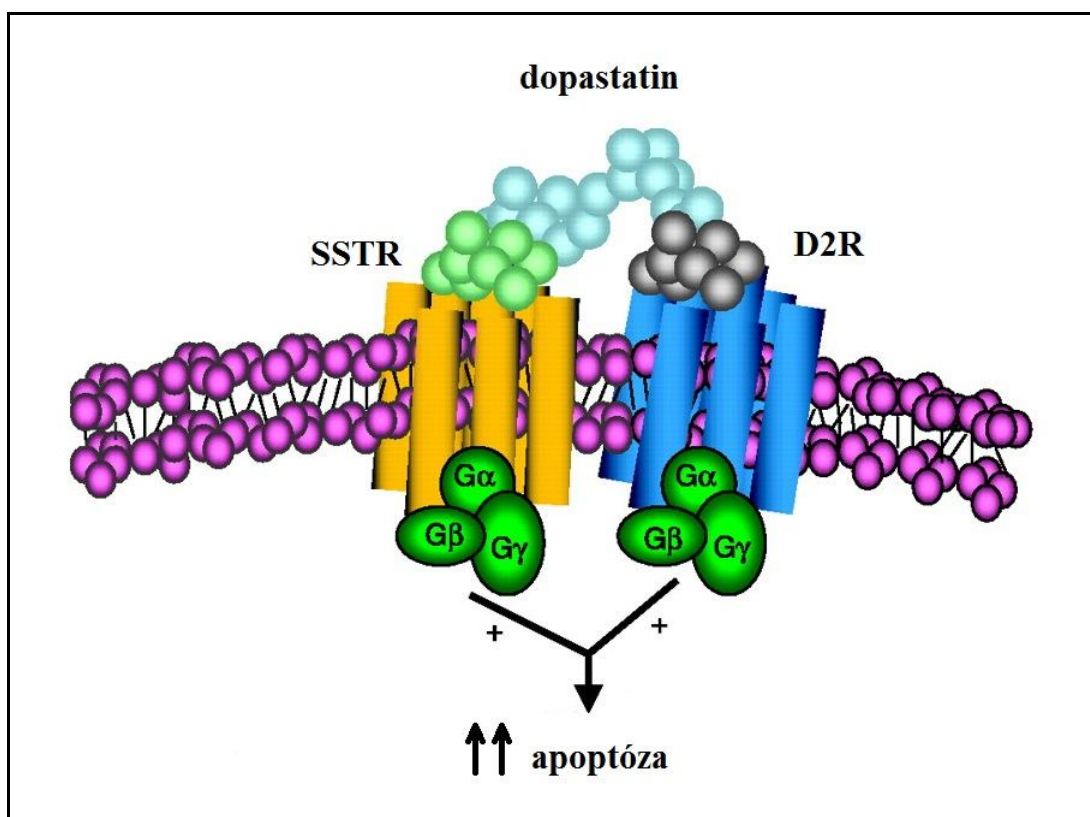
Oproti předchozím SA vykazuje vysokou afinitu ke čtyřem z pěti SSTR, čímž se nejvíce přibližuje k přirozenému SST. Ve srovnání s oktreotidem má až 30–40 krát vyšší afinitu k SSTR1 a SSTR5, k SSTR3 asi jen pětkrát a k SSTR2 vykazuje přibližně stejnou afinitu. Díky tomu může být využit k léčbě pacientů s akromegalií nebo s neuroendokrinními

tumory s daleko vyšší efektivitou [Modlin et al. 2010]. Své uplatnění našel hlavně v léčbě ACTH-produkujících adenomů hypofýzy, které exprimují na svém povrchu zejména SSTR5, méně pak SSTR2 a SSTR1. Proto byl v listopadu 2012 doporučen americkým výborem Food and Drug Administration's Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee pro léčbu Cushingovy choroby [Marek 2012].

2.2.6 Terapeutický efekt somatostatinových analog v léčbě adenomů hypofýzy

Efekt SA je závislý na expresi SSTR, které patří do skupiny membránových receptorů spřažených s G proteiny. Účinek SA je ovlivněn typem receptoru, na který se SA váže. Udává se, že vazba přes SSTR1, SSTR2, SSTR5 má antiproliferační a antiangiogenetický účinek a prostřednictvím SSTR3 účinek proapoptotický [Pisarek et al. 2011, Colao et al. 2009]. Podle literárních pramenů závisí míra exprese somatostatinových receptorů na typu hypofyzárního adenomu, ale mnohdy se liší i v rámci jedné skupiny [Pisarek et al. 2009]. Práce Taboada et al. [2007] popisuje u KAA vysokou expresi SSTR3 a nižší expresi SSTR2 u všech vyšetřených vzorků, zatímco v práci Miller et al. [1995] byla exprese SSTR3 přítomna pouze v 9 ze 47 vyšetřovaných adenomů. Rozporuplnost informací je dána malým počtem vzorků v publikovaných studiích.

Podle současných hypotéz může míra exprese predikovat odpověď na léčbu dostupnými SA (oktreotid a lanreotid), které mají vysokou afinitu k SSTR2 a SSTR5 a nízkou afinitu vůči SSTR1, SSTR3 a SSTR4 [Van der Hoek et al. 2007]. Kromě SSTR jsou na povrchu hypofyzárních adenomů zastoupeny i dopaminové receptory (DR), zejména subtyp D2R. Podobně jako u SSTR je jejich exprese variabilní [Nishioka et al. 2011]. Různé typy receptorových proteinů tvoří v cytoplazmatické membráně buněk adenomu homodimery a heterodimery, které ovlivňují funkce jednotlivých receptorů [Rocheville et al. 2000a, Rocheville et al. 2000b]. Heterodimer složený z D2R a SSTR5 vytváří nový receptor s vysokou funkční aktivitou, který dobře reaguje na kombinovanou léčbu SA a DA. Po šestiměsíční kombinované léčbě došlo u 60 % pacientů s neúplnou chirurgickou resekci k redukci nádoru minimálně o 10 % [Andersen et al. 2001]. V porovnání s kombinovanou léčbou vykazují chimérické molekuly (dopastatiny na obrázku 9) spojující účinek SA a DA lepší terapeutický efekt i při nižším dávkování [Ferone et al. 2009].



Obrázek 9 Heterodimer tvořený SSTR a D2R [Ferone et al. 2009]

SSTR4 je u hypofyzárních nádorů schopen vytvářet heterodimery s SSTR2 nebo s SSTR5, a bránit tak vazbě SA. První výsledky ukazují, že vyšší exprese SSTR4 může negativně ovlivnit efekt SA při léčbě adenomů [Slabý et al. 2009]. Toto tvrzení však není podloženo dostatečným množstvím důkazů a mělo by být cílem dalšího zkoumání.

Přestože je léčba KAA pomocí DA a SA zatím předmětem klinického výzkumu, zdá se, že afinita jednotlivých léků k SSTR a D2R hraje klíčovou roli ve výsledném účinku na buňky tumoru. Kromě heterodimerů SSTR s D2R může být efekt léčby adenomů hypofýzy SA pozitivně ovlivněn estrogény, resp. modulátory estrogenových receptorů.

2.3 Estrogeny a estrogenové receptory

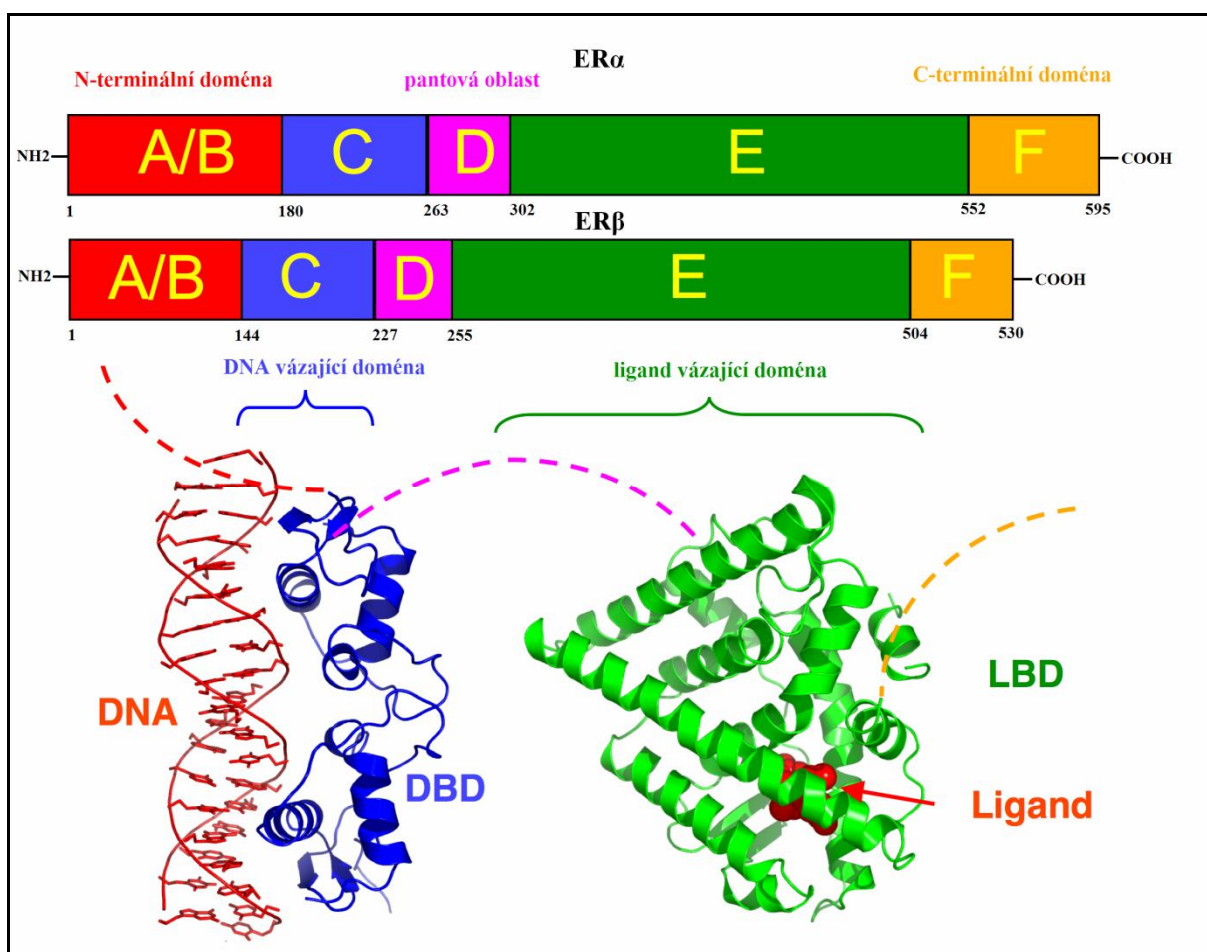
2.3.1 Estrogeny a jejich účinek

Estrogeny patří mezi steroidní hormony, které jsou důležité při rozvoji sekundárních pohlavních znaků. Hrají úlohu v reprodukčním období a mají vliv i na funkce kardiovaskulárního, muskuloskeletálního, imunitního a centrálního nervového systému. Nerovnováha hladin estrogenů v organismu podmiňuje výskyt patologických procesů, jako jsou nádory prsu a endometria nebo osteoporóza. Nejúčinnějším a nejvíce zastoupeným

estrogenem v těle je 17β -estradiol, v menší míře se vyskytují i estrol a estriol [Björnström et al. 2005, Heldring et al. 2007].

2.3.2 Estrogenové receptory

Biologický účinek estrogenů je zprostředkován pomocí estrogenových receptorů (ER), které patří do široké rodiny jaderných receptorů. Počátky jejich objevů sahají do padesátých let minulého století a jsou významně spjaty se jménem profesora Elwooda Jensena. Ten v roce 1958 objevil a charakterizoval protein vázající estrogen, který je dnes znám jako ER- α , ER1 [Jensen et al. 1960]. V letech 1985–1986 byl gen pro tento receptor lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 6 v oblasti 6q24-q27, následně klonován a sekvenován [Walter et al. 1985, Greene et al. 1986, Gosden et al. 1986]. Až v roce 1995 byl objeven druhý ER, který dostal označení ER- β , ER2 [Mosselman et al. 1996]. Pomocí hybridních a následně FISH technologií byla upřesněna chromozomová lokalizace jeho genu (14q22-q24) [Enmark et al. 1997].



Obrázek 10 Struktura jaderného ER [Kumar et al. 2011]

Stejně jako ostatní členové rodiny jaderných receptorů se i ER skládají z několika nezávislých domén (viz obrázek 10), které však spolu interagují a vykazují specifické funkce. Centrální a nejvíce konzervativní doménou je tzv. „DNA-vázací doména“ (DBD), označovaná také jako C doména. V této části jsou ER1 a ER2 velmi homologní (95 %). Prostřednictvím DBD se ER váže na specifickou oblast DNA, tzv. „estrogen responzivní jednotku“ (estrogen responsive elements, ERE), která je tvořena hexanukleotidovou palindromovou sekvencí. Na N-terminálním konci ER se nachází N-terminální doména (NTD) označovaná jako A/B. Tato doména má schopnost aktivovat transkripci, jež je nezávislá na vazbě estrogenů nebo antiestrogenů. Tato funkce je označovaná jako AF-1 (aktivační funkce 1). Pro plnou aktivaci AF-1 *in vitro* je nutná fosforylace serinu v pozici 118. aminokyseliny v ER, která je možná i cestou mitogenní signální dráhy Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase). ER1 a ER2 vykazují v NTD doméně pouze 15% homologii a liší se i v počtu AK.

D-doména, která následuje za DBD, se označuje jako pantová oblast (hinge region) a představuje středovou část receptoru s velkou flexibilitou. Homologie ER1 a ER2 je zde 36 %. Doména nezbytná pro vazbu ligandu je označována jako LBD (ligand binding domain) nebo také jako E doména. Představuje největší oblast ER obsahující 250 aminokyselin u ER1 a 249 u ER2; homologie obou typů ER v této doméně nepřevyšuje 55 %. Struktura E domény je tvořena 12 spirálami obsahujícími „kapsu“, do které se váže ligand. E doména je hlavní oblastí zodpovědnou za dimerizaci receptorů a aktivaci transkripce závislé na ligandech. Tato funkce je označována jako AF-2 (aktivační funkce 2). Funkce AF-1 a AF-2 může být dále modulována přítomností koregulačních proteinů. Byly popsány jak koaktivátory, které zesilují transkripci, tak korepresory, které jí tlumí. Na C-terminálním konci receptoru je poslední doména označovaná jako F doména, o které je známo, že má také vliv na dimerizaci receptoru [Heldring et al. 2007, Nilsson et al. 2001, Kumar et al. 2011].

Nejsou-li ER aktivované, nacházejí se z větší části v buněčné cytoplazmě ve vazbě s HSP 90 (heat-shock protein). Je-li však přítomný vhodný ligand, dochází po jeho vazbě ke změně konformace, v důsledku které receptor může vytvořit komplexy s ligandem. Tyto komplexy se k sobě navzájem přikládají a formují homodimery schopné translokace do buněčného jádra. Následně pak dochází k fosforylaci AF1 a konformační změně LBD, a k aktivaci AF2. Tyto změny umožní vazbu aktivovaného receptoru na ERE, jejímž výsledkem je ovlivnění transkripce genů způsobem popsaným v předchozím odstavci. Dynamika celého procesu je tak dána afinitou ligandu, afinitou komplexu ER/ligand k

ERE a přítomností koregulátorů. Tento způsob přepisu se označuje jako klasický nebo také genomický [Hall et al. 2001].

Vedle intracelulárně lokalizovaných receptorů pro estrogenu existují také transmembránové estrogenové receptory, které jsou cestou aktivace protein kinázové kaskády odpovědné za okamžité (tzv. nengenomové) účinky, např. rychlou vazodilataci [Björnström et al. 2005]. Transmembránové receptory tvoří 2–3 % ER receptorů [Pietras et al. 1980].

2.3.3 Modulátory estrogenových receptorů v léčbě adenomů hypofýzy

Selektivní modulátory estrogenových receptorů představují nehormonální působky, které jsou schopny vazby a aktivace tkáňových ER1. Zvláštností této skupiny látek je, že vzhledem k přirozeným estrogenům mohou působit agonisticky, ale také antagonisticky v závislosti na typu a lokalizaci receptoru ve tkáních. Původně byly tyto substance označovány jako tzv. antiestrogeny, zejména pro svoji schopnost antagonizovat proliferační účinky estrogenů v reprodukčních orgánech. Za určitých specifických podmínek, představovaných zejména parakrinní regulací, však tyto stejné substance mohou působit naopak, tj. jako agonisté. Tento typ účinku byl pozorován především na kostech, srdci a játrech [Kuiper et al. 1998].

V léčebném použití je tedy možné využívat estrogenní působení těchto modulátorů na některé orgány při současném omezení potenciálně negativních účinků na pohlavní orgány či mléčnou žlázu. Své uplatnění proto našly především v prevenci či léčbě karcinomu prsu, osteoporózy, a díky příznivému ovlivnění lipidového metabolismu vedoucího ke snížení LDL-cholesterolu, také ke snížení rizika ICHS u žen po menopauze [Delmas et al. 1997].

Doposud nebylo publikováno dostatek prací, které by mapovaly expresi ER1 u KAA. Byl popsán účinek hormonu estrogenu na buňky hypofýzy, který u nich snižoval expresi D2R a naopak zvyšoval expresi ER1 [Lloyd et al. 1991], SSTR2 a SSTR3 [Visser-Wisselaar et al. 1997]. V jiné práci [Nishioka et al. 2011] byla u osob mladších 50 let popsána korelace exprese ER1 a SSTR. Pomocí *in vitro* studií na krysích buňkách bylo prokázáno, že estrogenu zvyšují expresi SSTR2 a SSTR3 u zdravé hypofýzy a prolaktinomů. Stejných výsledků bylo dosaženo i při pokusech na krysách, kde se navíc ukázalo, že estrogenu mírně zvyšují expresi SSTR1 a výrazně inhibují SSTR5 [Patel 1999a].

Zdá se, že stimulační účinky estrogeneru, resp. modulátorů ER1, na expresi SSTR2 a SSTR3 by mohly pomoci zefektivnit léčbu klinicky afunkčních adenomů s nízkou expresí SSTR a zvýšit citlivost nádorů k léčbě SA.

Pro výběr vhodných typů KAA ke kombinované léčbě SA a modulátory ER1 bude patrně nezbytné u každého nádoru stanovit profil SSTR, D2R a ER1 receptorů. Získané znalosti o receptorové výbavě nádorových buněk by mohly přispět k racionálnímu využívání cílené biologické léčby u této skupiny nádorů.

3 Cíle disertační práce

V rámci této práce jsme si stanovili následující cíle:

- 1) Pomocí rekombinantních technik vytvořit paletu referenčních vzorků s definovaným množstvím transkriptů příslušných genů pro kalibrační a kontrolní účely.
- 2) Provést optimalizaci a validaci metod pro kvantitativní analýzu exprese estrogenového a somatostatinových receptorů a vyšetřit všechny operované adenomy hypofýzy.
- 3) Korelovat výsledky vyšetření exprese receptorů s klinickými a imunohistochemickými daty.
- 4) U KAA zvolit skupinu vhodnou k medikamentózní léčbě v případě rezidua nebo recidivy po operaci.
- 5) Připravit podmínky pro zavedení analýzy kvantitativní exprese receptorů pro rutinní použití.

4 Použité metody a soubor nemocných

4.1 Soubor vyšetřovaných pacientů

Ve studii byly vyšetřeny adenomy hypofýzy získané od 206 osob při resekci transsfenoidálním přístupem na neurochirurgických klinikách 1. Lékařské fakulty UK, Ústřední vojenské nemocnice Praha-Střešovice a Fakultní nemocnice Hradec Králové. Soubor složený z 105 mužů a 101 žen měl medián věku 61 roků (rozsah 20–87 roků, 25% kvantil 51 roků, 75% kvantil 68 roků). Diagnózy osob zahrnovaly klinicky afunkční adenom (144 případů), akromegalii (44 případů), Cushingovu chorobu (9 případů), prolaktinom (6 případů) a TSH adenom (3 případy). Studie byla schválena příslušnými regionálními etickými komisemi a všichni pacienti podepsali před odběrem písemný informovaný souhlas.

4.2 Klinická a imunohistochemická charakteristika adenomů

Hypofyzární adenomy byly pomocí nukleární magnetické rezonance charakterizovány velikostí, směrem a lokalizací infiltrace. Medián velikosti byl 23 mm, rozsah souboru byl 3–50 mm. 17 adenomů expandovalo intraselárně, 79 supraselárně, 13 supraselárně a paraselárně, 2 paraselárně, 81 supraselárně a do *sinus cavernosus*, 6 supraselárně, paraselárně i do *sinus cavernosus* a 8 do *sinus cavernosus*.

Tkáň adenomu byla fixována v 10% formalinu a zalita do parafinu. Parafinové řezy byly barveny hematoxylin-eozinem a Goldbergovým trichromem. Vazivo bylo barveno Gomoriho stříbřením. Pro imunohistochemickou analýzu byly použity monoklonální protilátky Immunotech, Praha, ČR (STH, PRL, TSH, FSH, LH) a Dako, Glostrup, Dánsko (ACTH). Pro semikvantitativní hodnocení exprese hormonů byla použita stupnice 0 (negativní nález), 1 (pozitivita maximálně v 15 % buněk), 2 (pozitivita v 15–70 % buněk) a 3 (pozitivita minimálně v 70 % buněk).

4.3 Molekulárně biologická analýza exprese receptorů

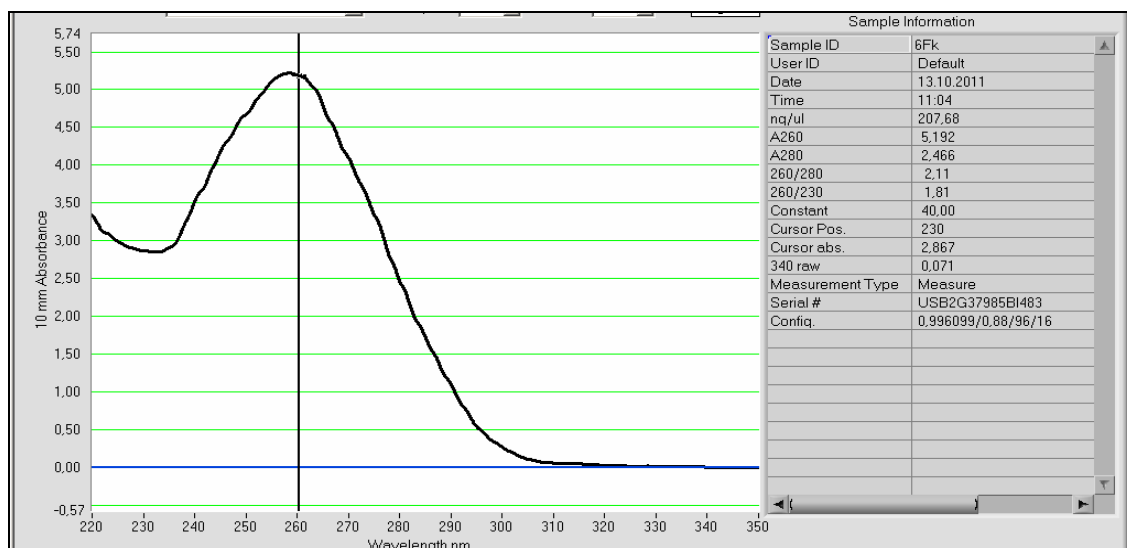
4.3.1 Extrakce RNA

Část resekovaného nádoru byla ihned po vyoperování vložena do zkumavky se stabilizačním roztokem zajišťujícím integritu nukleových kyselin (RNAlater Tissue Protect, Qiagen). Vzorek byl poté uchováván při teplotě -80 °C až do doby zpracování.

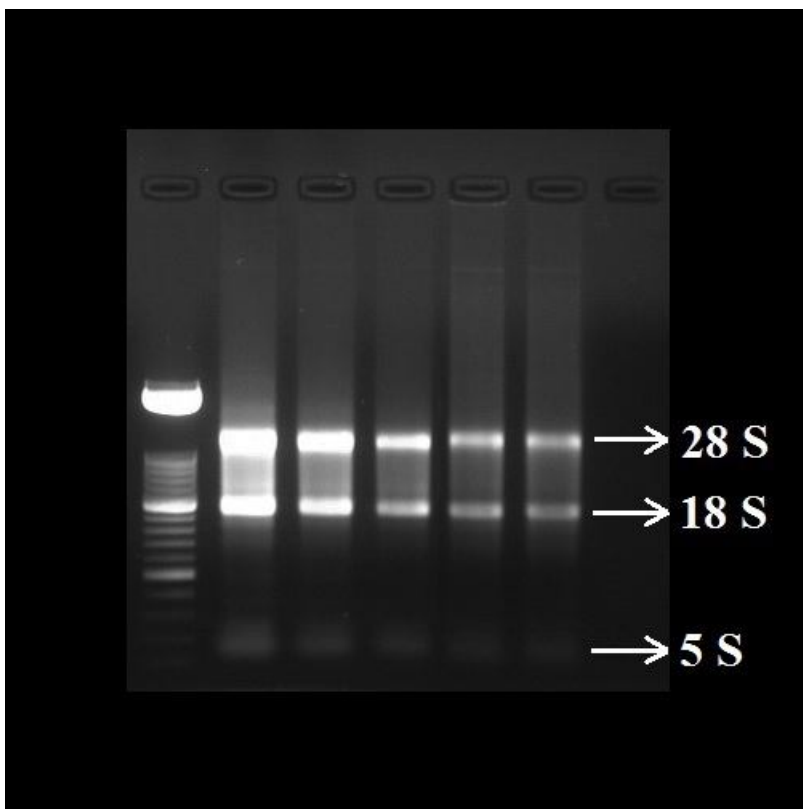
V laboratoři po rozmražení byly všechny vzorky zváženy a v případě hmotnosti přesahující 50 mg rozřezány na několik dílů pomocí sterilního jednorázového skalpelu. Z každé části nádoru byl pak vybrán díl tak, aby výsledná hmotnost tvořila maximálně 50 mg. Zvážené vzorky byly přeneseny do zkumavek MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics) naplněných 1000 ul Trizolu Reagent (Invitrogen) a v přístroji MagNA Lyser (Roche Diagnostics) se provedla homogenizace za těchto podmínek: 60 cyklů/s, po dobu 90 s. Izolace dále pokračovala fenol/chloroformovou extrakcí dle pokynů výrobce.

Po izolaci RNA jsem z důvodu případné kontaminace DNA, která by mohla falešně zvyšovat expresi receptorů, zařadila ještě 20min inkubaci s DNase I recombinant (Roche Diagnostics) při 30 °C.

Koncentrace a čistota vyzolované RNA byly stanoveny pomocí UV spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Pro stanovení čistoty je důležitý poměr absorbancí při vlnových délkách 260/280 nm, který by se měl pohybovat mezi 1,8 a 2,1, a poměr 260/230 nm by neměl klesnout pod 1,6. Záznam spektrofotometrické křivky je na obrázku 11. Vzorky které nevyhovovaly těmto podmínkám, byly vyřazeny. Optimální koncentrace RNA pro reverzní transkripci byla dle doporučení výrobce 70 ng/μl. Vzorky s vyšší koncentrací byly naředěny a vzorky s nižší koncentrací vyřazeny. Integritu RNA jsme hodnotili dle provedené elektroforézy (viz obrázek 12).



Obrázek 11 Záznam ze spektrofotometru Nanodrop ND-1000



Obrázek 12 Elektroforetický záznam vzorků RNA. Poznámka: V první dráze zleva je velikostní marker MIV (Roche Diagnostics)

4.3.2 Reverzní transkripce

Koncentračně optimalizované vzorky RNA byly přepsány do stabilnější formy cDNA (complementary DNA) dle podmínek udaných výrobcem kitu SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen).

4.3.3 Real-time PCR

Transkript cDNA sloužil jako templát pro vlastní kvantifikaci receptorové exprese. 5 μ l z něj se připipetovávalo do 20 μ l směsi obsahující TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM forward (fw) a reverse (re) primerů a 200 nM hydrolytické fluorescenční sondy. Jejich sekvence jsou rozepsány v tabulce 9. Ke stanovení SSTR4 a ER1 byly použity komerční kity Taqman Gene Expression Assays Hs01566620_s1 a Hs00174860_m1 (Invitrogen).

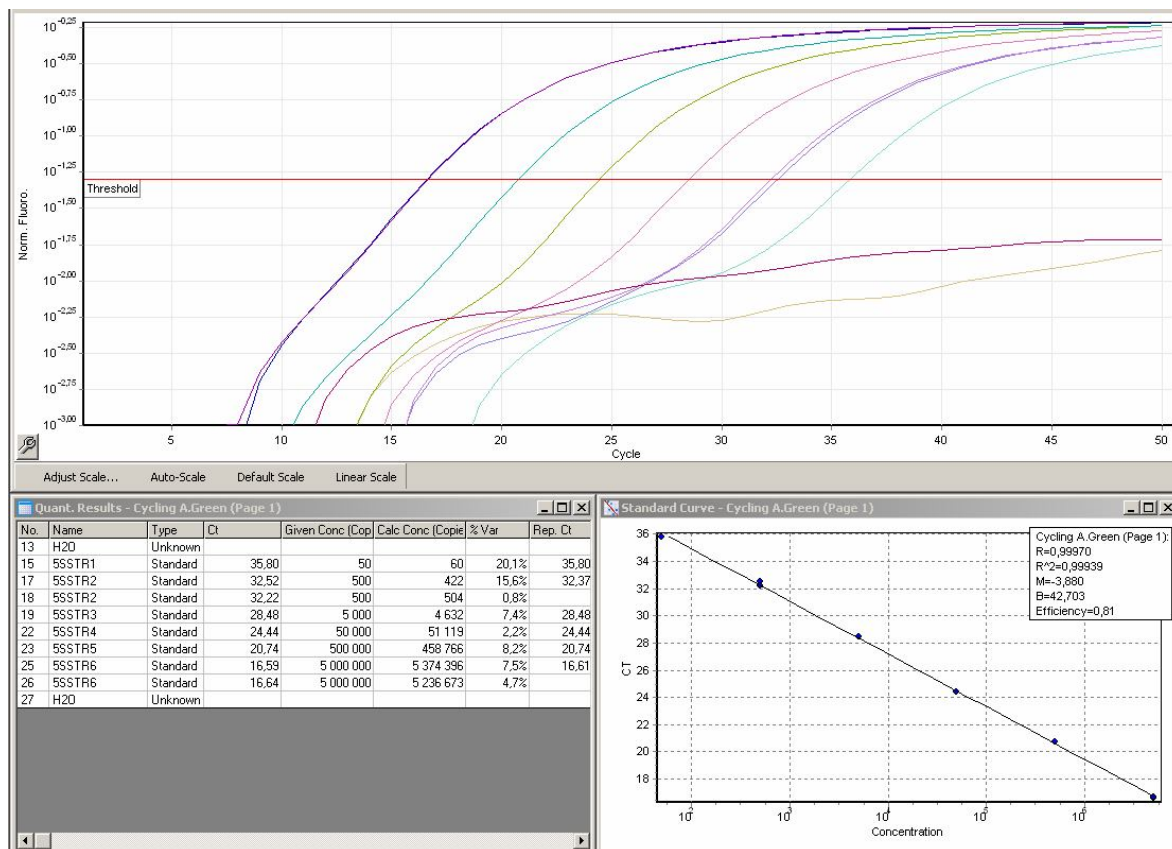
Real time PCR reakce probíhala ve stroji RotorGene 6000 thermal cycler (Corbett Research, Australia) při 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, tato úvodní denaturace pak pokračovala 50 cykly skládajícími se z 15s denaturace při 95 °C a annealingu spolu s extenzí při 60 °C po dobu 1 min.

Tabulka 9 Sekvence primerů a sond stanovovaných receptorů. Poznámka: sekvence primerů pro SSTR4 a ER1 výrobce neuvádí

Označení	Sekvence
SSTR1-fw	5-GCT AGG ACA CTG ACA GCC TTT GA-3
SSTR1-re	5-GTA GCC TGA AAG CCT TCC CA-3
SSTR1-probe	5-FAM-CCC AAG AAA GGC GCG CGA CAA T-TAMRA-3
SSTR2-fw	5-GCC TCC AGG GTC CAT TAA GG-3
SSTR2-re	5-ATT GAG TGG CTC ATC CGC C-3
SSTR2-probe	5-FAM-AGA ATA AGA TCT CTG GGC TGG CTG GAA-TAMRA-3
SSTR3-fw	5-TGG GCC TGC TGG GTA ACT-3
SSTR3-re	5-GAT GTA GAC GTT GGT GAC TGA AGG-3
SSTR3-probe	5-FAM-CAT CTA TGT GGT CCT GCG GCA CAC G-TAMRA-3
SSTR4-probe	5-FAM-GCC AAT GCC AGT AGC GCT CCG GCG G-TAMRA-3
SSTR5-fw	5-CTG GTG CCA AGG ACG CT-3
SSTR5-re	5-GCT GCC GGA TCC TGT CTG-3
SSTR5-probe	5-FAM-ACG CCA CGG AGC CGC GT-TAMRA-3
ER1-probe	5-FAM-TGA TGA AAG GTG GGA TAC GAA AAG A-TAMRA-3
D2R-fw	5-CAA GAC CAT GAG CCG TAG GAA G-3
D2R-re	5-TGT GTG TGA TGA AGA AGG GCA G-3
D2R-probe	5-FAM-CCC AGC AGA AGG AGA AGA AAG CCA CTC A-TAMRA-3

Pro odečet absolutních koncentrací jsme použili plazmidy pCR4 (Invitrogen) se zaklonovanými inzerty SSTR1–5, ER1 a D2R (Generi Biotech, Česká republika). Z výchozí koncentrace 10^7 kopií/ μ l jsme postupným ředěním získali 6 kalibračních standardů (10^6 – 10^1) a po analýze v dubletech jsme sestavili kalibrační křivku. Záznam kalibrační křivky je na obrázku 13.

Aby bylo možné exprese jednotlivých receptorů mezi sebou porovnávat, přepočítali jsme naměřené absolutní hodnoty expresí na hodnotu housekeepingového genu beta-glukuronidáza (*GUS*) a získali jsme tak relativní zastoupení expresí.



Obrázek 13 Kalibrační křivka pro SSTR5

4.4 Statistická analýza

Ke statistické práci byly využity programy Statistica v.12 (StatSoft, Praha, ČR), MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgie) a tabulkový procesor Microsoft Office Excel 2007. Pro hodnocení normality dat byl použit Shapiro-Wilkův W test. Hodnocení významnosti změn mezi soubory dat bylo provedeno pomocí neparametrického Mann-Whitneova U testu. Za statisticky významné byly považovány změny při hodnotě $p < 0,05$.

Grafy lineární regrese byly sestaveny pomocí Microsoft Office Excel 2007. Krabicové grafy (MedCalc) znázorňují hodnotu mediánu (střední příčka), horní a dolní okraje tvoří 25. a 75. kvantil, vynesené úsečky pak hodnotu 99. kvantilu.

5 Výsledky

5.1 Určení normality hodnot exprese receptorů

Ke statistickému zhodnocení výsledků byla nejprve testována normalita získaných dat. Základními zpracovávanými parametry byly počty kopií transkriptů všech sedmi receptorů (SSTR1–5, D2R a ER1) normalizovaných na počty transkriptů house-keepingového genu *GUS*. Rozložení hodnot transkriptů pro jednotlivé typy adenomů jsou znázorněny v tabulkách 10–14. Pomocí Shapiro-Wilkova *W* testu nebyla zjištěna normalita dat u žádné z diagnóz podmíněných hypofyzárními nádory. Proto byly pro testování hypotéz použity výhradně neparametrické statistické testy.

Tabulka 10 Základní charakteristika souboru osob s akromegalií (n=44). Hodnoty jsou vyjádřeny v počtech kopií RNA po normalizaci na počty transkriptů GUS

AKRO	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil
SSTR1	54	12	1	514	4	23
SSTR2	450	174	1	5133	51	519
SSTR3	48	14	0	639	3	57
SSTR4	1	0	0	54	0	0
SSTR5	107	17	0	1395	0	62
D2R	873	516	2	4773	221	1124
ER1	198	32	1	2083	12	108

Tabulka 11 Základní charakteristika souboru osob s Cushingovou chorobou (n=9)

CUSH	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil
SSTR1	772	46	11	4175	29	1006
SSTR2	121	49	24	389	45	188
SSTR3	21	7	1	121	4	21
SSTR4	4	1	0	18	0	3
SSTR5	86	2	0	580	0	16
D2R	2185	1099	112	10505	552	1644
ER1	1350	607	24	8186	55	815

Tabulka 12 Základní charakteristika souboru osob s KAA (n=144)

KAA	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil
SSTR1	399	7	0	26796	3	14
SSTR2	95	25	1	2034	6	66
SSTR3	80	23	0	1041	6	81
SSTR4	2	0	0	32	0	1
SSTR5	6	0	0	136	0	3
D2R	1546	325	0	17356	92	2142
ER1	459	54	0	14359	16	200

Tabulka 13 Základní charakteristika souboru osob s prolaktinomem (n=6)

PROL	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil
SSTR1	192	130	72	523	92	196
SSTR2	23	18	8	54	11	28
SSTR3	2	1	0	7	0	3
SSTR4	2	0	0	8	0	1
SSTR5	69	17	0	333	4	40
D2R	4614	3172	1287	9802	2769	6505
ER1	1795	1665	794	3199	901	2517

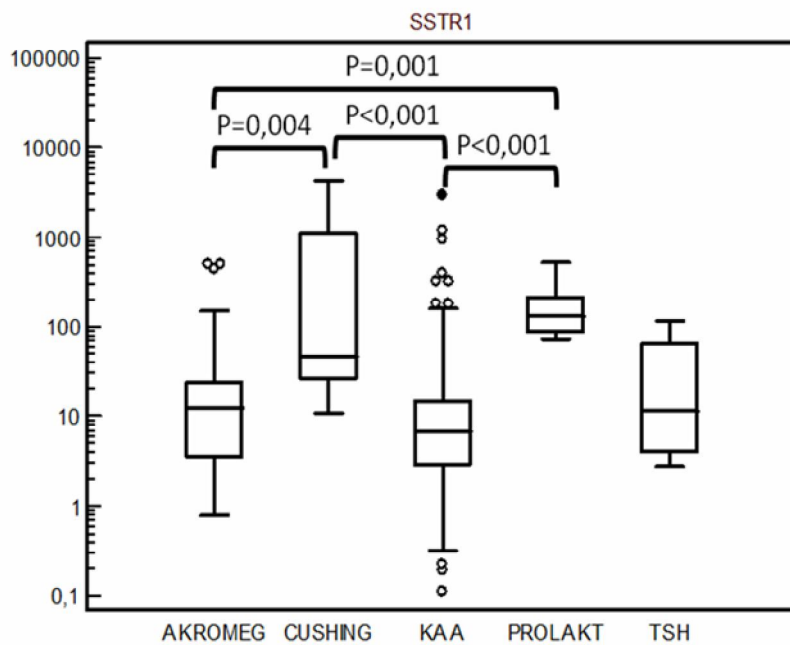
Tabulka 14 Základní charakteristika souboru osob s TSH adenomem (n=3)

TSH	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil
SSTR1	43	11	3	116	7	64
SSTR2	2084	551	353	5348	452	2950
SSTR3	0	0	0	1	0	0
SSTR4	1	1	0	1	1	1
SSTR5	24	0	0	72	0	36
D2R	938	440	60	2314	250	1377
ER1	67	68	1	132	35	100

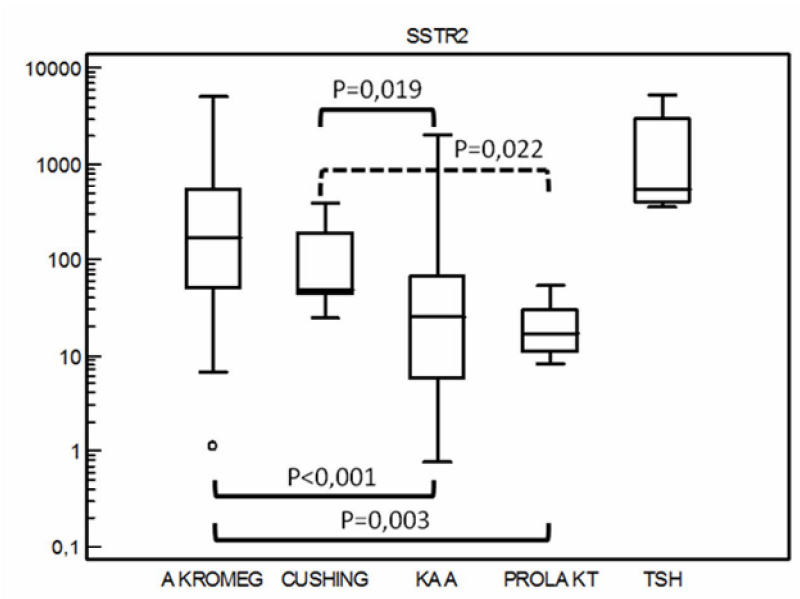
5.2 Hodnocení exprese receptorů v závislosti na diagnóze

Relativní exprese jednotlivých receptorů (po normalizaci přepočtem na množství transkriptů GUS) byla charakterizována v závislosti na klinické diagnóze. Krabicové grafy 1–7 obsahují svorky statistické významnosti. Hodnoty na ose y jsou vyneseny v logaritmickém měřítku. AKROGMEG je skupina akromegaliků, CUSHING jsou osoby s

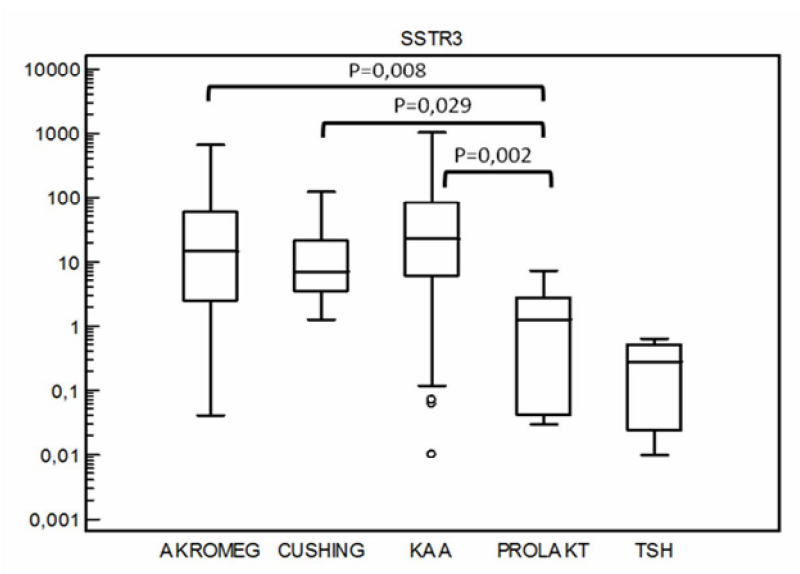
Cushingovou chorobou, KAA jsou klinicky afunkční adenomy, PROLAK jsou prolaktinomy, TSH je TSH adenom. Expres SSTR1 byla statisticky nejvyšší ve skupině osob s Cushingovou chorobou a s prolaktinomem. Receptory SSTR2 byly nejvýznamněji vyjádřeny u akromegalie a Cushingovy choroby; vysoké hodnoty exprese u TSH adenomů nebylo možno hodnotit pro malé počty osob v této skupině (n=3). Množství transkriptů SSTR3 bylo významně vyšší u akromegalie, Cushingovy choroby a KAA než u prolaktinomu. SSTR4 exprese u hypofyzárních tumorů je obecně velmi nízká, relativně nejvyšší byla prokázána u diagnózy Cushingova choroba. Naopak SSTR5 byla nejvyšší u akromegaliků a prolaktinomů. Prolaktinomy a případy Cushingovy choroby měly vyšší hodnoty exprese pro D2R a ER1.



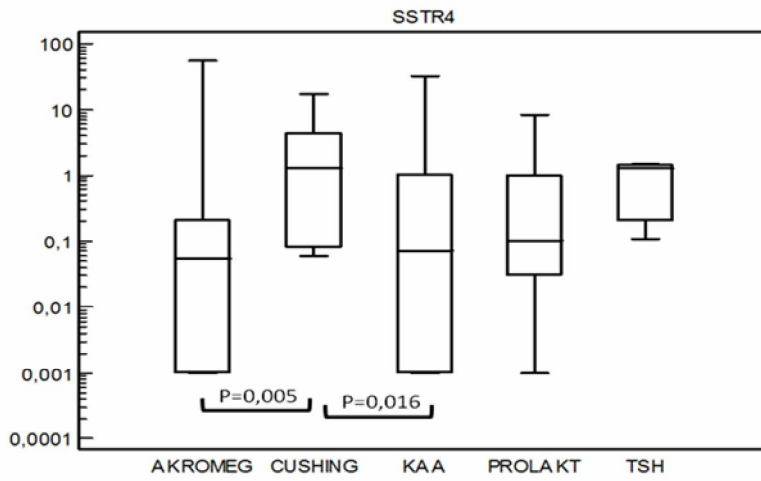
Graf 1 Expres SSTR1



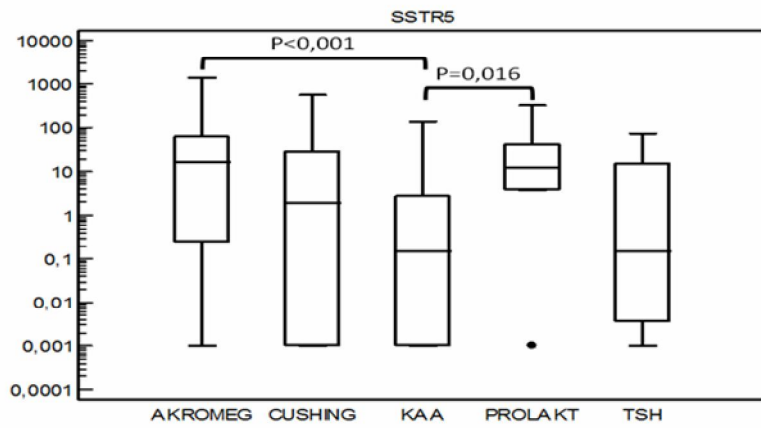
Graf 2 Ekspresi SSTR2



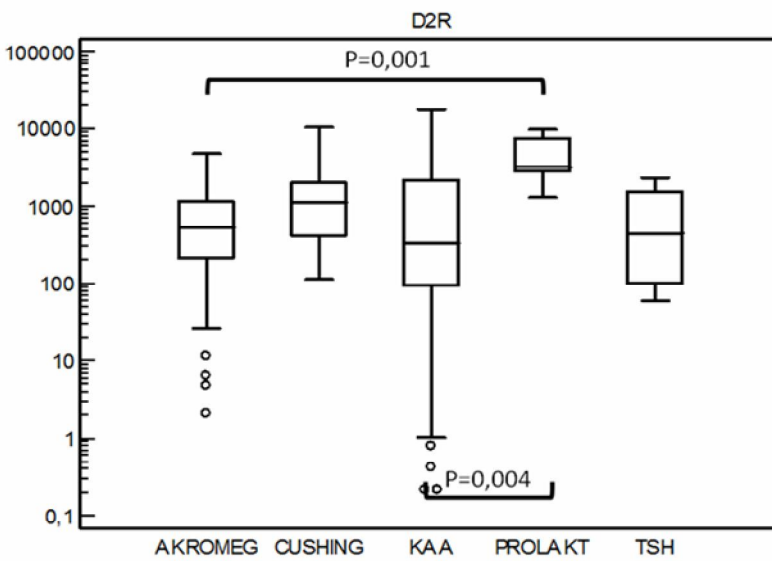
Graf 3 Ekspresi SSTR3



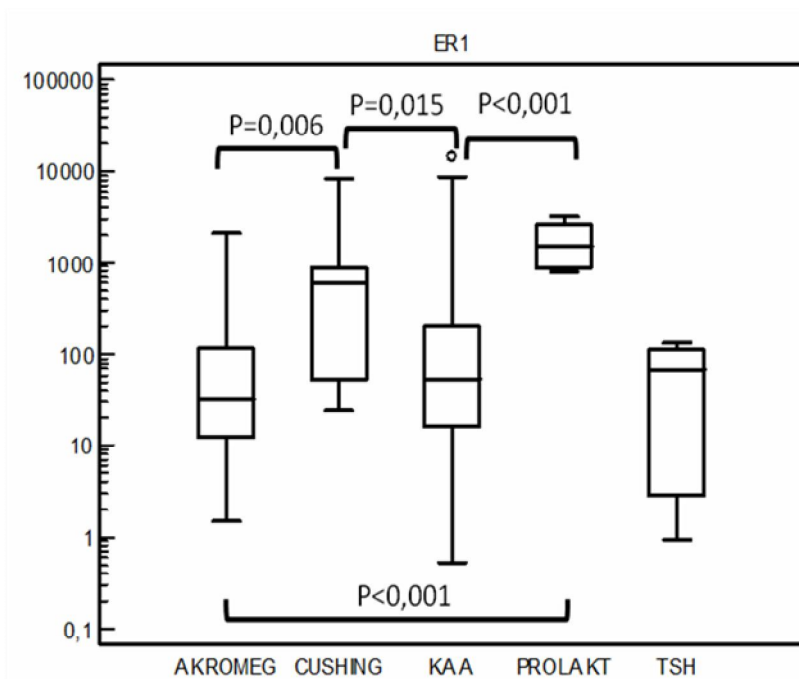
Graf 4 Expres SSTR4



Graf 5 Expres SSTR5



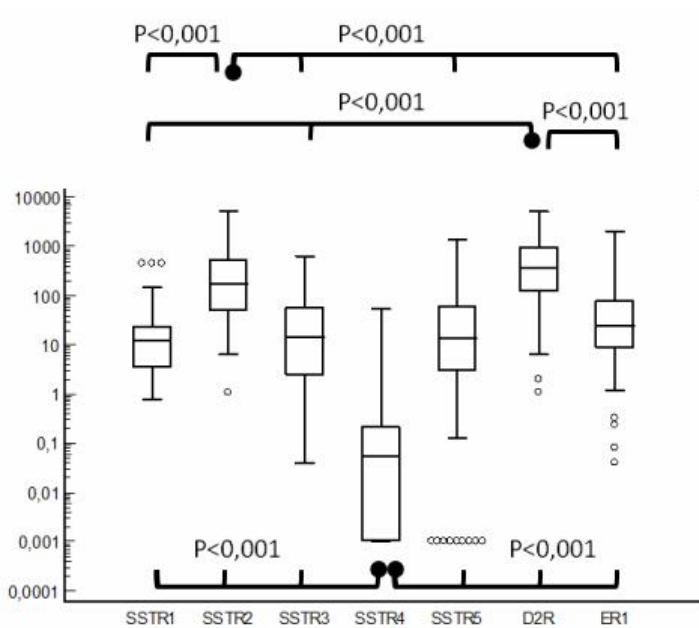
Graf 6 Expres D2R



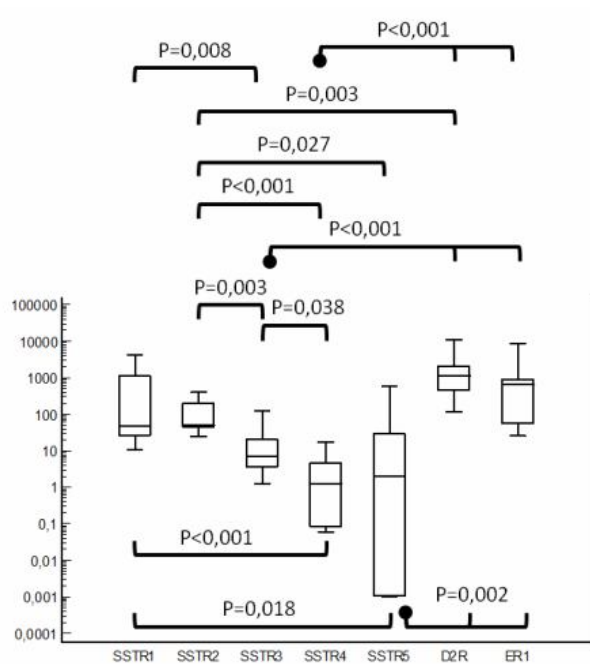
Graf 7 Expres ER1

5.3 Expresní profily jednotlivých typů hypofyzárních adenomů

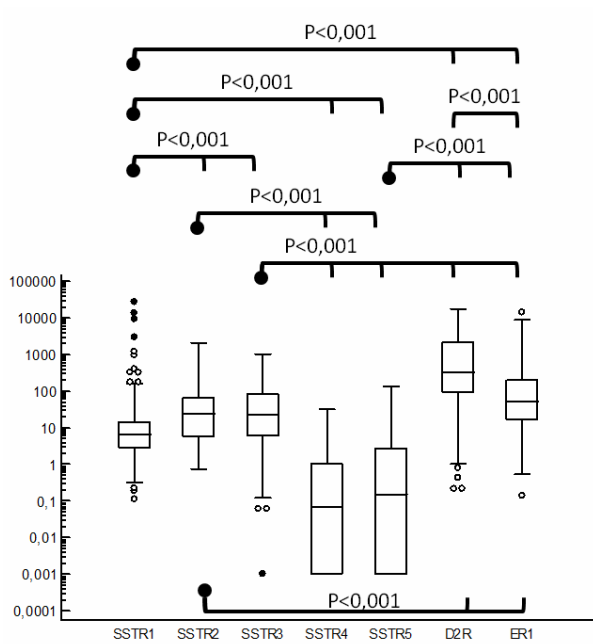
V této části práce byly hodnoceny jednotlivé diagnózy z hlediska relativní exprese všech studovaných receptorů a určeny jejich charakteristické profily (grafy 8–12). Pro akromegalii byla typická vysoká exprese receptorů SSTR2 a D2R. Cushingova choroba tvoří v hypofyzární tkáni velké množství D2R a ER1, méně pak SSTR1 a SSTR2. Podobné spektrum mají i KAA, kde jsou však zvýšeny též SSTR3; SSTR1 je zde naopak výrazně nižší. V profilu prolaktinomu dominují D2R, ER1, SSTR1, ale významněji též SSTR5. V malém souboru TSH adenomů byla pozorována vyšší hladina D2R a SSTR2, avšak významnost rozdílů nebylo při malém počtu těchto vzorků možno prokázat.



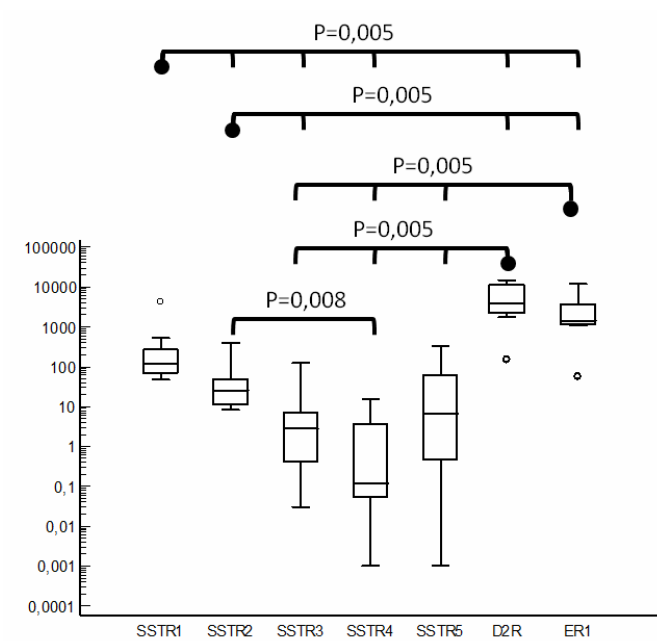
Graf 8 Expresní profil receptorů u akromegalie. Logaritmičké měřítko na ose y vyjadřuje expresi relativní vůči GUS. Černé tečky u svorek významnosti vyjadřují referenční proměnnou vůči expresím jiných receptorů



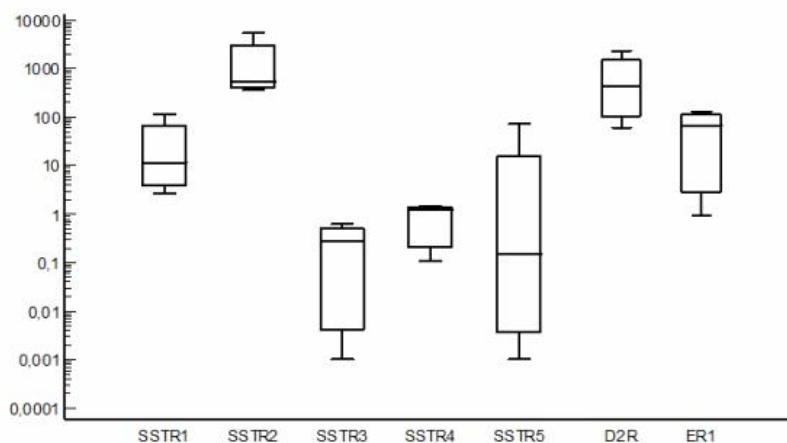
Graf 9 Expresní profil receptorů u Cushingovy choroby



Graf 10 Expresni profil receptoru u KAA



Graf 11 Expresni profil receptoru u prolaktinomu



Graf 12 Expresní profil receptorů u TSH adenomů

Množství transkriptů receptorů typických pro jednotlivé diagnózy jsou patrné také z mediánů exprese uvedených v tabulce 15.

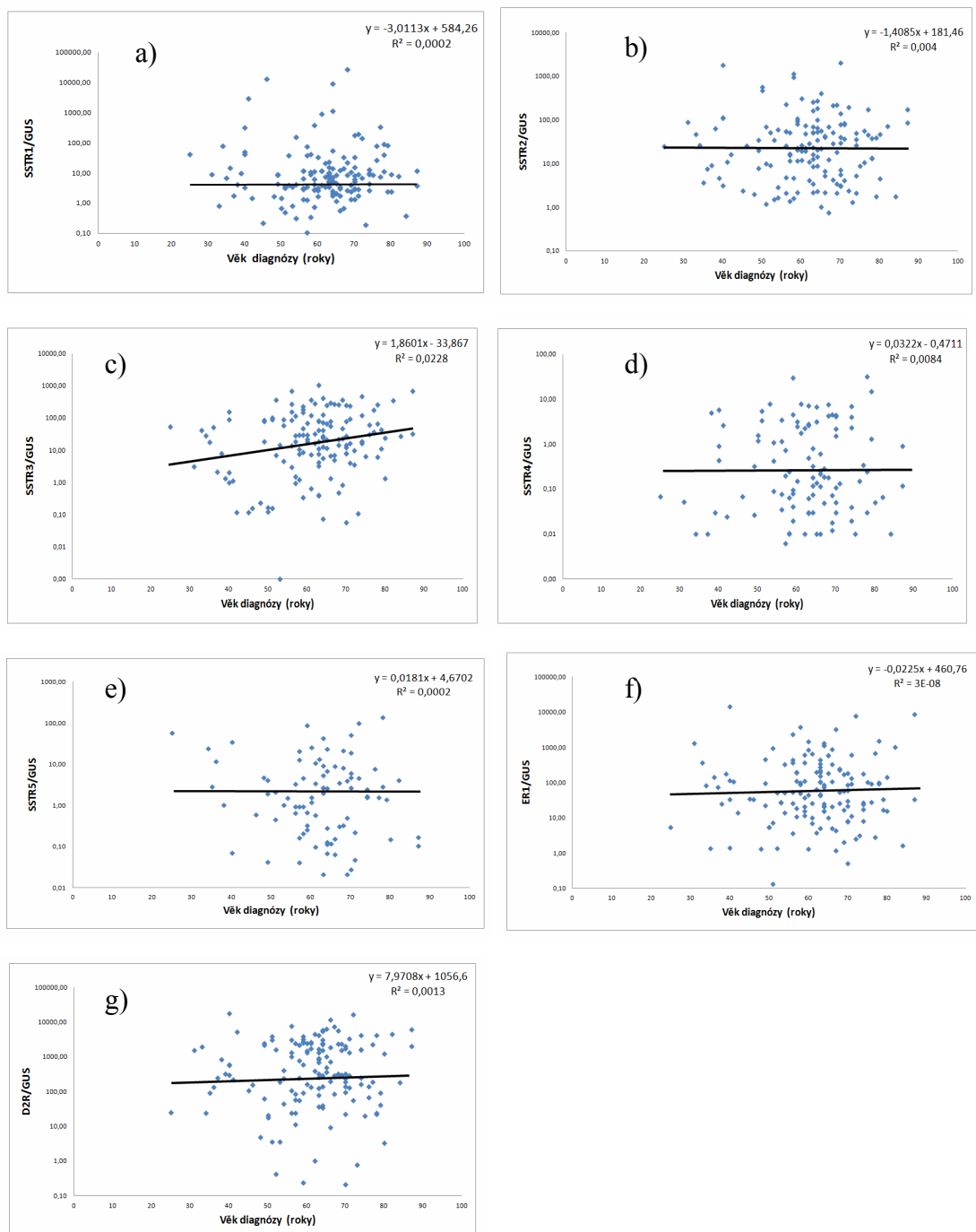
Tabulka 15 Mediány relativní exprese receptorů v závislosti na diagnóze

	AKRO n=44	CUSH n=9	KAA n=144	PROLAKT n=6	TSH n=3
SSTR1	12	46	7	130	11
SSTR2	174	49	25	18	551
SSTR3	14	7	23	1	0
SSTR4	0	1	0	0	1
SSTR5	17	2	0	17	0
D2R	516	1098	325	3172	440
ER1	32	607	54	1665	68

5.4 Exprese receptorů u KAA v závislosti na věku

Vzhledem k relativně vysokému počtu vzorků KAA ve sledovaném souboru (144 osob) bylo možné uskutečnit podrobnější statistickou analýzu a nastínit případnou souvislost s klinickými a laboratorními proměnnými. V první analýze byla hodnocena závislost exprese na věku.

Regresní analýza neprokázala ani u jednoho z receptorů věkově vázanou expresi v odebrané tkáni. Na příložených grafech 13 a–g je patrné, že výskyt adenomů je nejčastěji diagnostikován v šestém a sedmém deceniu věku. Medián věku byl u našich pacientů s KAA 63 roků (rozsah souboru 25–87 roků).



Grafy 13 a–g Expresce receptorů v závislosti na věku osob s KAA v diagnóze. Na ose y jsou hodnoty relativní exprese vyneseny v logaritmickém znázornění

5.5 Expresce receptorů u KAA v závislosti na pohlaví

V této části studie byla hodnocena významnost rozdílů v expresi studovaných receptorů mezi muži a ženami. Populační charakteristiky souboru mužů a žen jsou uvedeny v tabulce 16. Naměřená data hodnocena pomocí Mann-Whitneyho U testu jsou v tabulce 17.

Tabulka 16 Věkové rozložení (v rocích) u skupin mužů a žen s diagnózou KAA

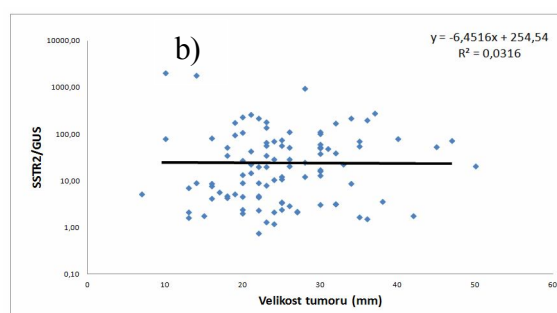
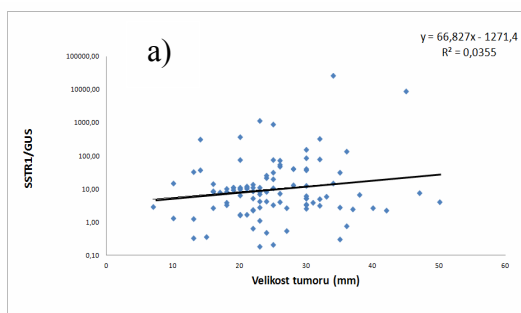
Pohlaví	Počet	Medián věku	Minimum	Maximum	Dolní (kvartil)	Horní (kvartil)
Ženy	68	63	31	87	56	68
Muži	76	63	25	84	54	70

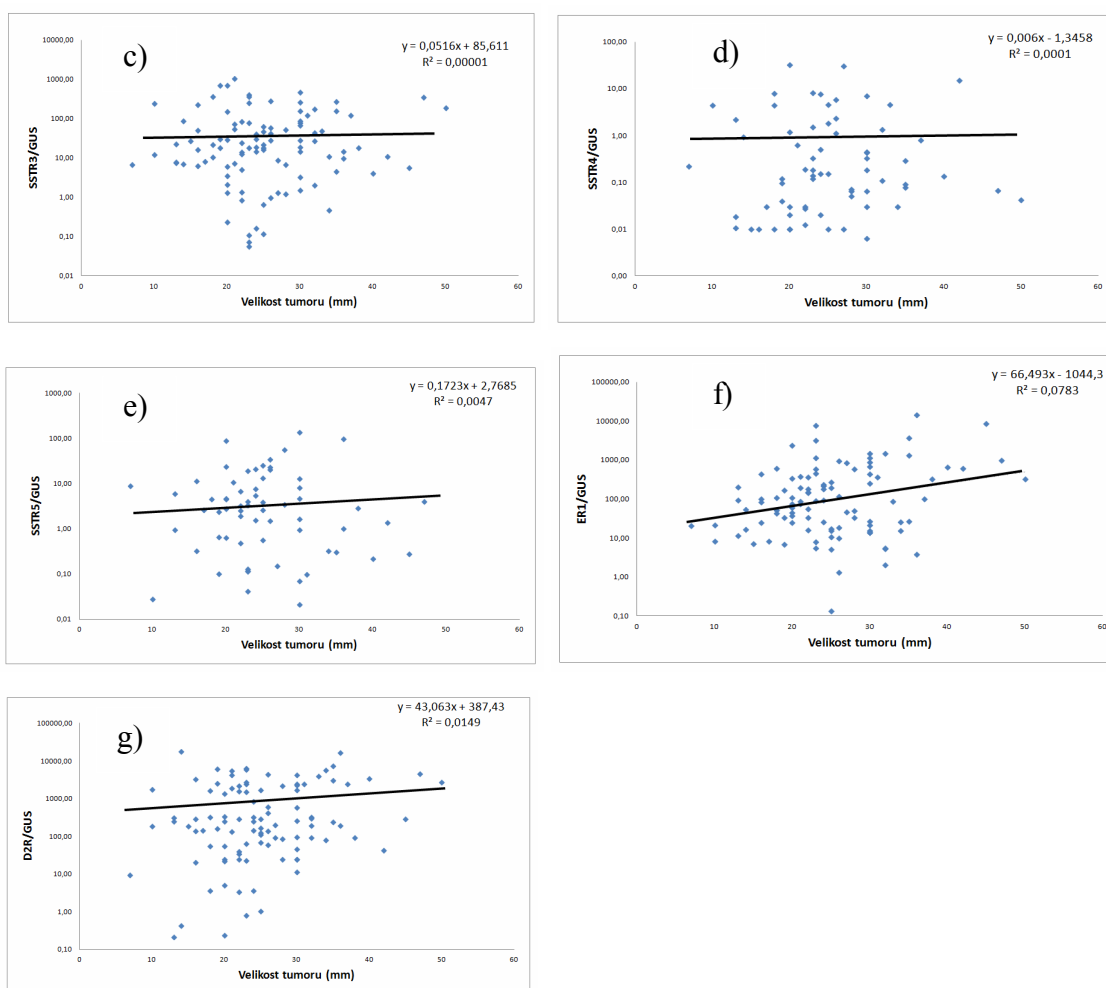
Tabulka 17 Expresce receptorů u KAA v závislosti na pohlaví

	ŽENY					MUŽI					p
	Medián	Min	Max	1.Q	3.Q	Medián	Min	Max	1.Q	3.Q	
SSTR1	8	0	26796	3	24	5	0	2911	2	12	0,129
SSTR2	32	1	966	9	73	20	1	2034	4	59	0,126
SSTR3	25	0	1041	4	76	22	0	414	7	84	0,590
SSTR4	0	0	31	0	1	0	0	32	0	1	0,844
SSTR5	0	0	99	0	3	0	0	136	0	3	0,414
D2R	474	0	16359	72	2397	317	0	17356	128	1690	0,667
ER1	52	1	8800	21	199	70	0	14359	12	219	0,878

5.6 Expresce receptorů u KAA v závislosti na velikosti tumoru

Korelační analýza ani zde neprokázala žádný signifikantní vztah mezi expresí receptorů v nádorové tkáni a velikostí KAA (grafy 14 a–g). Velikost byla určena pomocí zobrazovacích technik před provedeným operačním výkonem. Medián velikosti KAA byl u našich pacientů 24 mm, rozsah souboru 7–50 mm. Pro srovnání, mediány a rozsahy souborů u akromegalie, Cushingovy choroby, prolaktinomu a TSH byly 16 mm (3–40 mm), 8 mm (4–30 mm), 24 mm (9–56 mm) a 24 mm (5–30 mm).

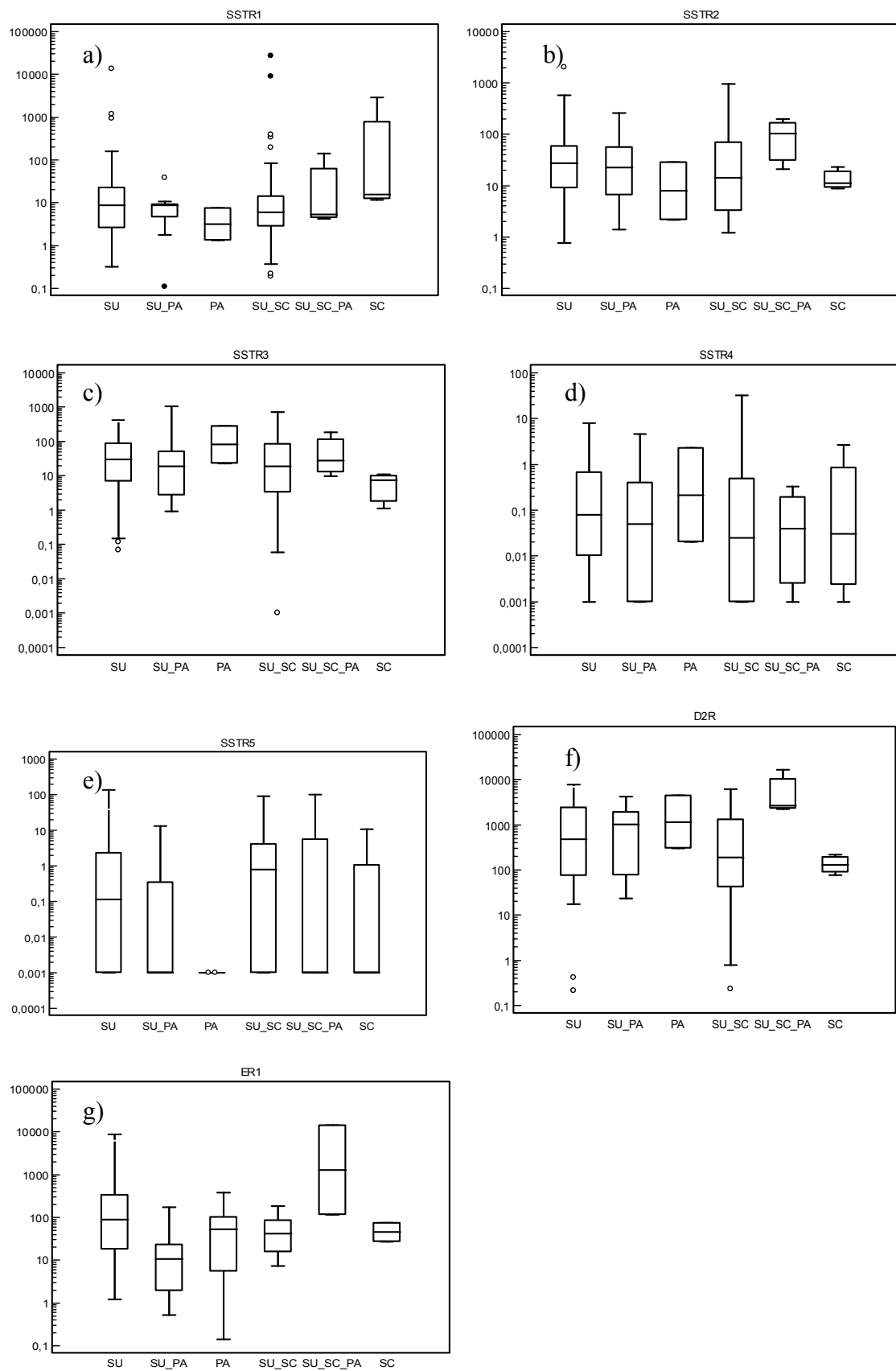




Graf 14 a–g. Hodnocení exprese receptorů v závislosti na velikosti KAA. Relativní exprese receptorů je znázorněna v logaritmickém měřítku

5.7 Exprese receptorů u KAA v závislosti na místě a směru infiltrace tumoru

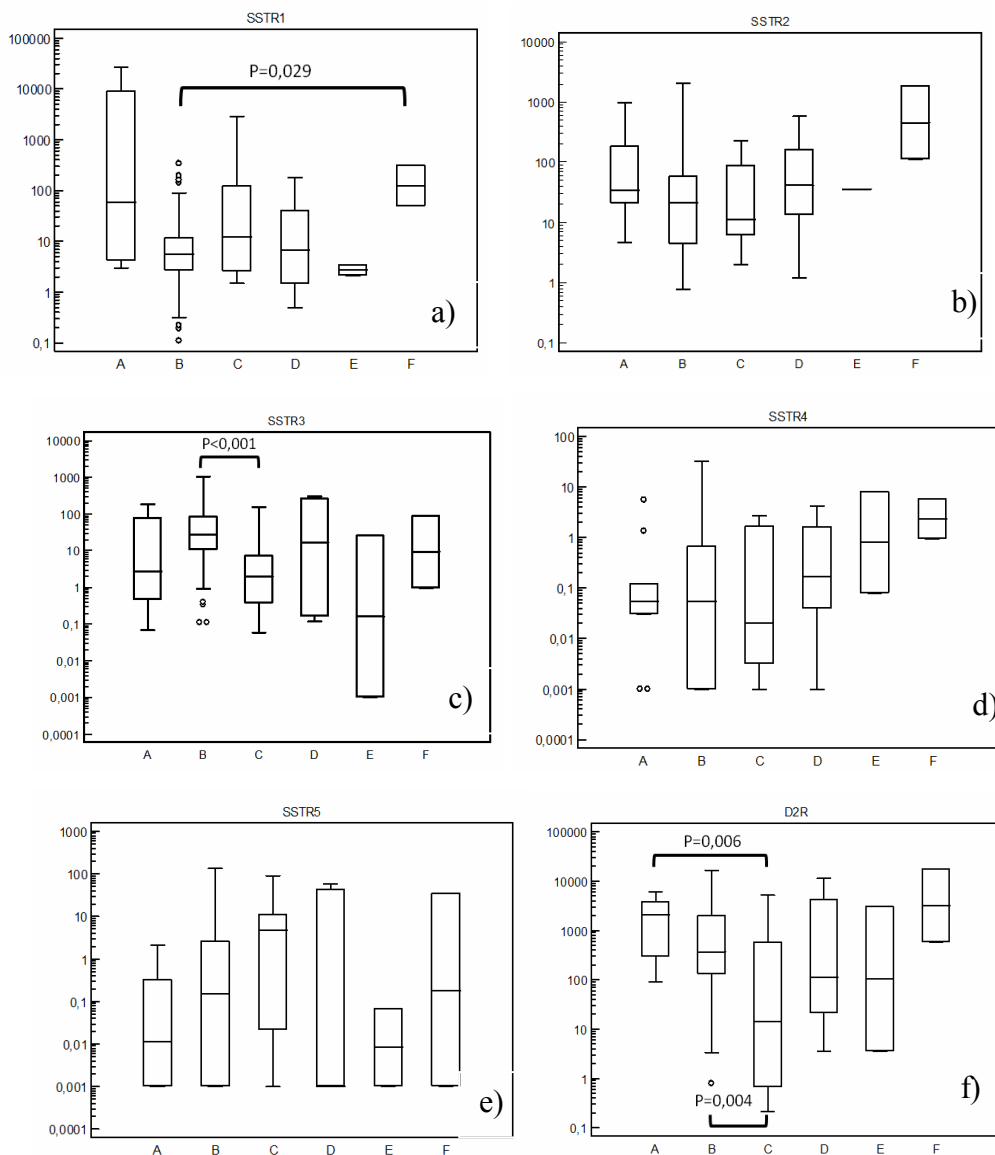
144 KAA expandovalo takto: 1 adenom intraselárně, 63 supraselárně (SU), 10 supraselárně a paraselárně (SU_PA), 2 paraselárně (PA), 61 supraselárně a do *sinus cavernosus* (SU+SC), 4 supraselárně, paraselárně i do *sinus cavernosus* (SU_SC_PA) a 3 do *sinus cavernosus* (SC). Z krabicových grafů 15 a–g vyplývá, že exprese receptorů patrně neasociuje se směrem prorůstání tumorů, nicméně pro přesnou statistiku chybějí v některých podskupinách dostatečné počty vzorků daného typu.

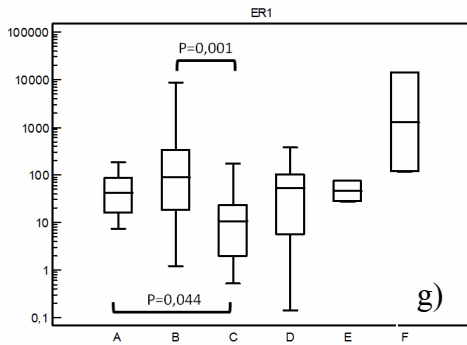


Graf 15a–g. Expresce receptorů v závislosti na směru růstu KAA, relativní exprese receptorů jsou znázorněny v logaritmickém měřítku

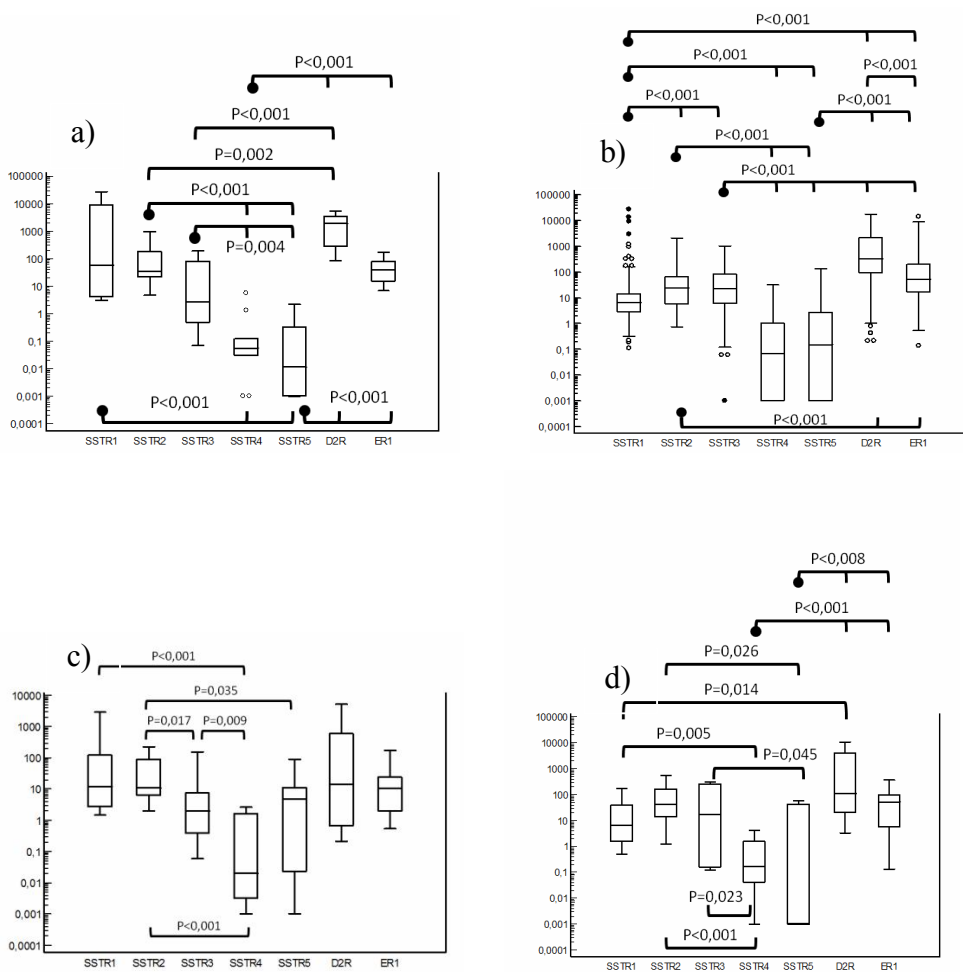
5.8 Exprese receptorů u KAA v závislosti na imunohistochemické klasifikaci

Podle imunohistochemické analýzy byly KAA rozčleněny na *null cell* tumory (n=10, sloupec A v grafu 16, gonadotropní KAA (n=108, B), tiché ACTH tumory (n=12, C), plurihormonální tumory (n=10, D), akromegalie klinicky neprokázané (n=2, E) a neprokázané prolaktinomy (n=2, F). Rozdíly v expresích receptorů mezi různými imunohistochemickými typy KAA nebyly příliš vyhraněné, statistická významnost zde byla spíše výjimečná. V grafech 17 a–d jsou dále znázorněny expresní profily *null cell* tumorů (a), gonadotropních KAA (b), tichých ACTH adenomů (c) a plurihormonálních tumorů (d).





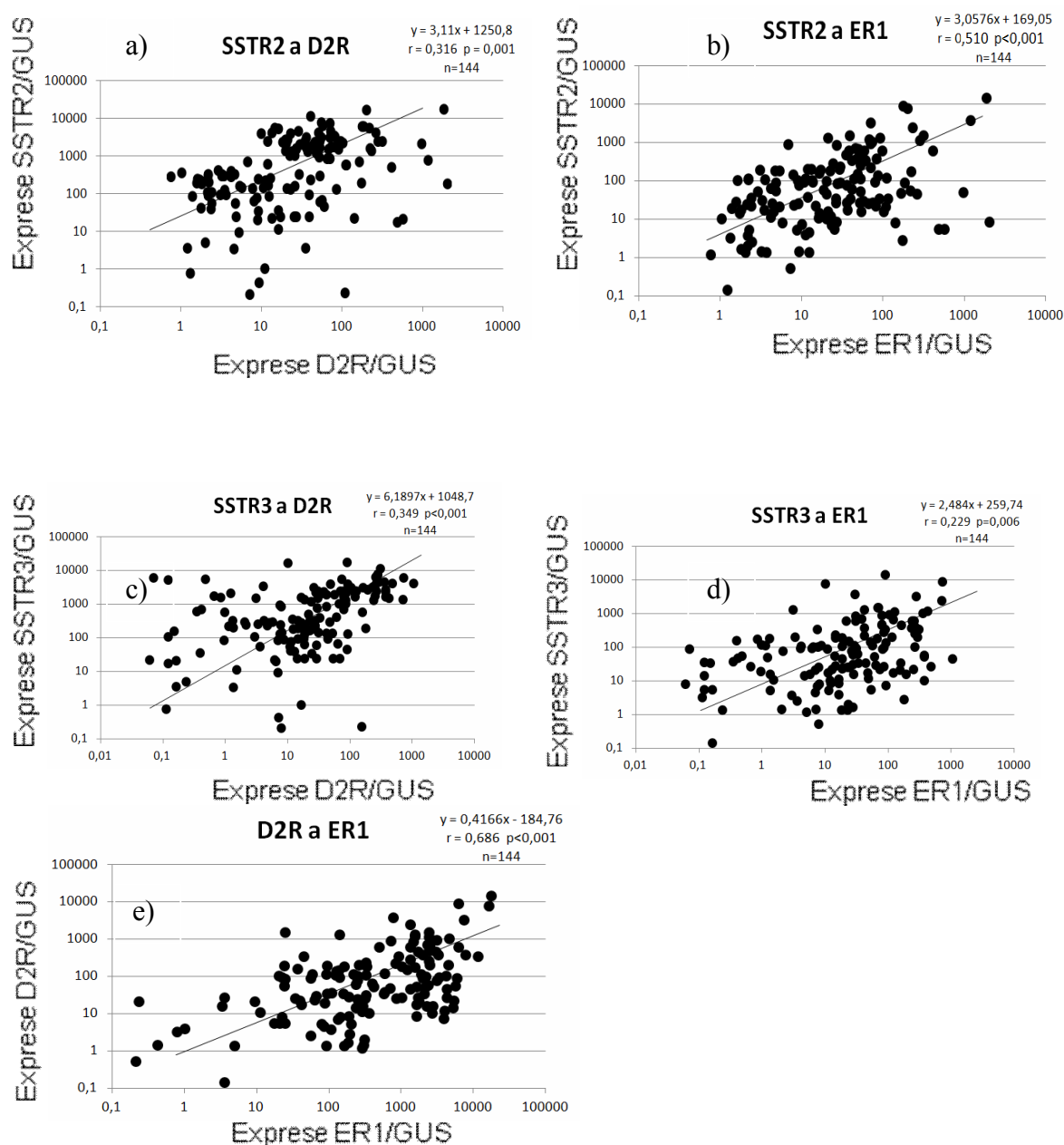
Graf 16 a–g. Rozdělení KAA podle imunohistochemické analýzy. Null cell tumory (A), gonadotropní KAA (B), tiché ACTH tumory (C), plurihormonální tumory (D), akromegalie klinicky neprokázané (E) a neprokázané prolaktinomy (F)



Graf 17 Expresní profily null cell tumorů (a), gonadotropních KAA (b), tichých ACTH tumorů (c) a plurihormonálních tumorů (d)

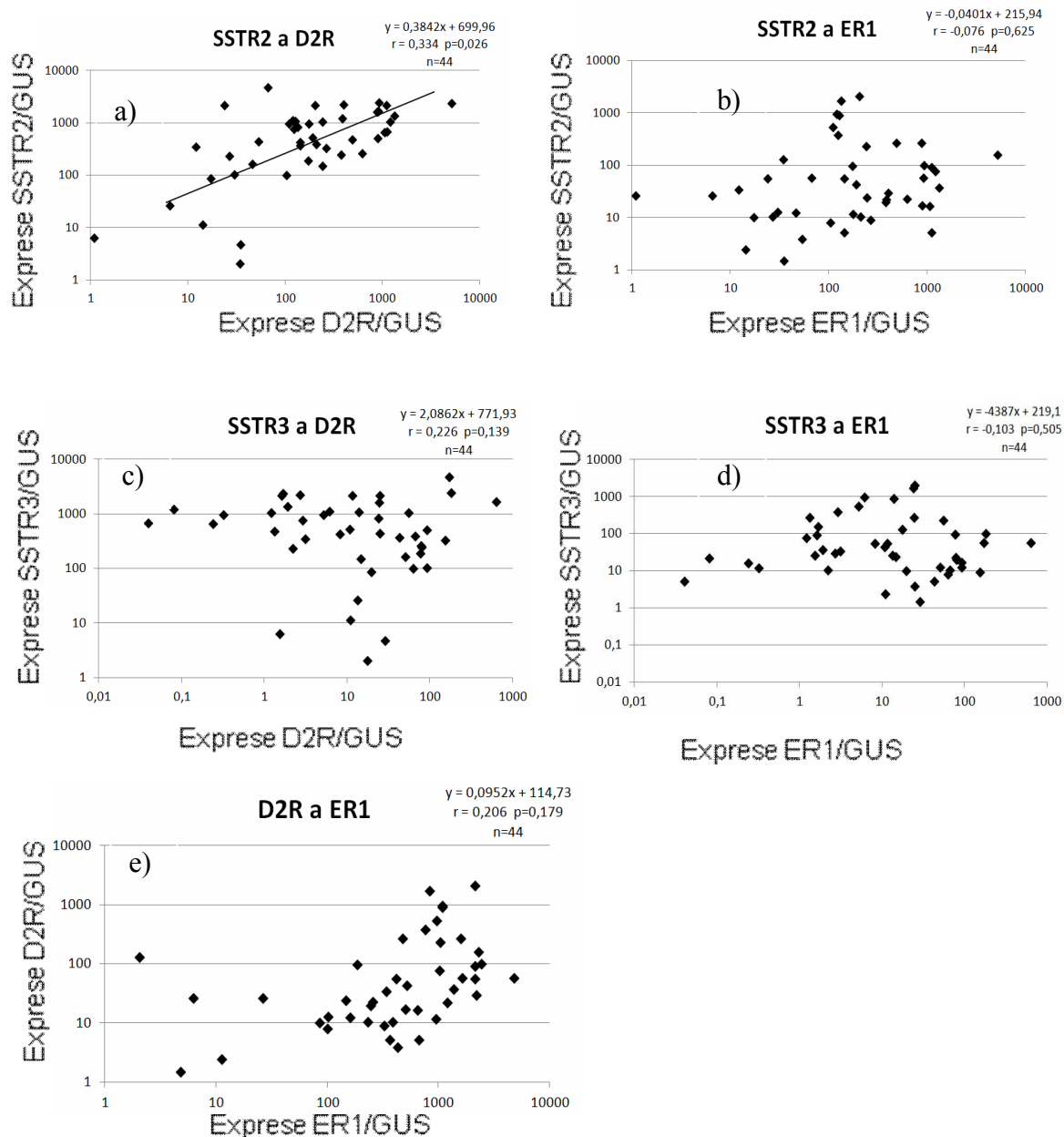
5.9 Porovnání míry vzájemné exprese receptorů u KAA

Grafy 18 a–e ukazují statisticky významné korelace mezi různými typy receptorů u KAA. Grafy jsou vyneseny v logaritmické škále na obou osách. Středně silná korelace ($r=0,686$) byla u KAA zjištěna mezi expresí dopaminových a estrogenových receptorů. Další vynesené grafy ukazují čtyři střední a slabé korelace.



Graf 18 a–e Vztahy mezi expresemi receptorů u KAA, na obou osách grafů jsou logaritmická znázornění naměřených hodnot

Pro srovnání byly vyneseny obdobné závislosti receptorů ve skupině 44 osob s akromegalií (Graf 19 a–e). V této skupině byly vzájemné asociace mezi receptory mnohem slabší. Hodnoty korelačních koeficientů nedosáhly hranice 0,4. Vztahy jsou závislé na individuálním expresním profilu adenomů, resp. na výšce exprese srovnávaných receptorů. V případě dalších diagnóz korelační analýza nebyla provedena z důvodu malého množství experimentálních vzorků.



Graf 19 a–e Relativní exprese receptorů u akromegalie. Typy grafů (porovnávaných receptorů) odpovídají skupině KAA znázorněné v grafu 18. Grafy jsou vyneseny na obou osách v logaritmické škále

6 Diskuse

Somatostatin má v organismu nezastupitelnou roli nejen v modulaci endokrinní a exokrinní sekrece, ale uplatňuje se též při inhibici proliferace buněk a spouštění apoptózy. Pro uskutečnění těchto funkcí jsou nezbytné SSTR přítomné v cytoplazmatické membráně. Udává se, že vazba SST na SSTR1, SSTR2 a SSTR5 vede k antiproliferačním a antiangiogenetickým účinkům a vazba na SSTR3 a SSTR2 má spíše účinek proapoptotický [Pisarek et al. 2011, Colao et al. 2009]. Inhibičních účinků somatostatinu na růst buněk a sekreci hormonů se využívá při léčbě nádorů pomocí syntetických SA.

Své uplatnění SA nalézají při léčbě GH-sekretujících adenomů, u kterých se nejčastěji indikují oktreotid a lanreotid. Oba tyto preparáty vykazují nejvyšší afinitu k receptorům SSTR2 a SSTR5 [Janečka et al. 2001]. V našem souboru čítajícím 44 pacientů s akromegalií byl mezi receptory SSTR nejvýznamněji exprimován SSTR2, dále medián expresí klesal v pořadí SSTR5>SSTR3>SSTR1. Ke stejným výsledkům dospěli ve své práci se 7 pacienty i Nielsen et al. [2001]. V práci Taboada et al. [2007], kteří sledovali expresi SSTR u 23 pacientů s akromegalií, dominovala exprese SSTR5 u 52 % a SSTR2 u 39 % adenomů. V našem souboru byla zjištěna vyšší exprese SSTR5 než SSTR2 jen u 10 pacientů (23 %).

SSTR2 vykazoval v naší práci signifikantně vyšší expresi u GH-sekretujících adenomů než u KAA a prolaktinomů, stejně tak exprese SSTR5 byla u akromegalie významně vyšší než u KAA. TSH-sekretující adenomy nebylo možno hodnotit pro malé počty osob v této skupině (n=3). Z našich výsledků tedy vyplývá, že pacienti s akromegalií jsou vhodnými kandidáty na léčbu SA (oktreotid a lanreotid), která normalizuje hladiny GH a IGF-1 u 60 % léčených a u 70 % dochází ke zmenšení nádorové hmotnosti [Colao et al. 2011]; výsledný efekt SA na GH-sekretující adenom pozitivně koreluje s expresí SSTR2.

Zhruba třetina osob s akromegalií na léčbu nereaguje z důvodu nedostatečného množství SSTR2 [Taboada et al. 2008] U těchto rezistentních pacientů je možné použít kombinaci SA a DA, která vykazuje vyšší účinnost ve srovnání s DA nebo SA podávanými v monoterapii [Colao, A. et al. 2007].

V našem souboru akromegaliků byla exprese D2R nevýznamně vyšší než SSTR2 (mediány relativních expresí vůči GUS u nich byly 516 a 174). Signifikantně vyšší exprese D2R byla prokázána u prolaktinomů oproti GH-sekretujícím adenomům a KAA, ale ve srovnání s ACTH-sekretujícími adenomy byla jejich transkripce vyšší jen nevýznamně. Tento náš

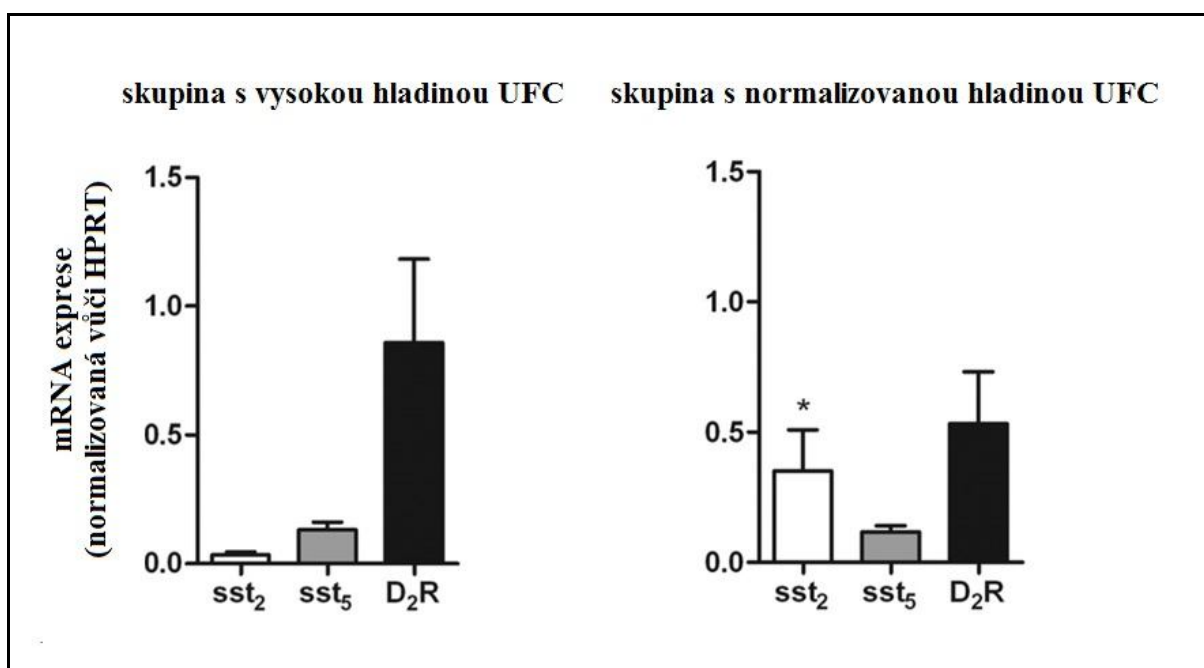
nález potvrzuje fakt, že D2R jsou primárně přítomny v laktotropních buňkách, ale jejich výskyt byl prokázán i na jiných typech hypofyzárních buněk [Renner et al. 1998].

Hlavní úloha D2R spočívá ve zprostředkování inhibičního efektu dopaminu z hypotalamu, který tak reguluje syntéza a sekrece PRL spolu s proliferací laktotropních buněk [Pivonello et al. 2007]. Tohoto inhibičního účinku se úspěšně využívá při léčbě prolaktinomů, u nichž dochází díky DA k normalizaci hladin PRL v 90 % mikroprolaktinomů a u 70 % makroprolaktinomů. Zástava růstu nádoru či jeho zmenšení byla popsána až u 80 % léčených osob [Colao et al. 2009]. Jen malá část pacientů je na léčbu rezistentní. V práci Jaquet et al. [1999] pomocí real time PCR, podobně jako naše práce, stanovovali expresi SSTR u 10 prolaktinomů. U sedmi mikroadenomů popsali nejvyšší expresi SSTR5, u dvou makroadenomů rezistentních na léčbu DA dominoval SSTR1 a u jednoho byla zjištěna velmi nízká exprese všech SSTR. Tyto výsledky se neshodují s našimi výsledky, ve kterých byl u prolaktinomů nejvíce exprimován SSTR1. Rozdíly mohou souviset se složením našeho souboru osob s prolaktinomem, z nichž všechny měly velikost nad 1 cm (10–46 mm), a šlo tedy o makroadenomy s indikací k operaci z důvodu neuspokojivé léčby DA. Výsledky analýzy zacílené na makroadenomy v obou studiích jsou ve shodě. Je třeba také poznamenat, že účinky somatostatinu a SA na sekreci PRL nejsou významné [Ben-Shlomo et al. 2010].

Estrogeny mají stimulační účinky na expresi SSTR2 a SSTR3 [Visser-Visselaar et al. 1997]. Ke stejným závěrům dospěly i *in vitro* experimenty na krysích buňkách zdravé hypofýzy a prolaktinomů [Djordjijevic et al. 1998]. U prolaktinomů byla prokázána korelace exprese ER1 a SSTR u osob mladších 50 let [Nishioka et al. 2011]. V našem souboru byl medián relativní exprese ER1 u prolaktinomů (hodnota 1665) nejvyšší při porovnání s ostatními diagnózami a v případě akromegalie (hodnota 32) a KAA (54) byl rozdíl expresí jednoznačně statisticky významný. Ve skupině PRL-sekretujících adenomů vykazoval ER1 signifikantně vyšší exprese než jakýkoliv receptor SSTR. Podávání modulátorů estrogenových receptorů by tak u těchto osob mohlo zvýšit expresi SSTR2, a potencovat tak inhibiční účinek SA na sekreci PRL u DA-rezistentních prolaktinomů, jak prokázaly pokusy na krysách léčených kombinací SA a estradiolu [Schussler et al. 1994].

U ACTH-sekretujících adenomů se v literatuře uvádí nejvyšší exprese SSTR5 a v menší míře SSTR2, jehož množství je inhibováno vysokou hladinou glukokortikoidů vyskytující se u Cushingovy choroby [Feelders et al. 2013]. Také de Bruin et al. [2009] ve své práci se 30 ACTH-sekretujícími adenomy popisuje 5 krát vyšší expresi SSTR5 vůči SSTR2. V našem souboru 9 pacientů se expresní profil receptorů vzhledem k výše uvedeným

literárním údajům lišil. Medián exprese SSTR5 byl ve srovnání s SSTR2 25 krát nižší, tento rozdíl expresí byl statisticky významný. Možnou příčinou odlišných výsledků mohla být předoperační léčba vedoucí ke snížení hladiny kortizolu, čímž mohlo dojít i k potlačení inhibičního efektu na expresi SSTR2. Tuto hypotézu potvrzují i výsledky práce van der Pas et al. [2013], která popisuje desetinásobně rozdílné hodnoty SSTR2 v závislosti na normalizaci hladin kortizolu před operací. Rozdíl expresí SSTR2 u pacientů s vysokou a normalizovanou hodnotou volného močového kortizolu (UFC) je znázorněn na obrázku 14.



Obrázek 14 Rozdíl expresí SSTR2 v závislosti na hladině volného močového kortizolu (UFC). Převzato a upraveno z publikace van der Pas et al. [2013]. HPRT (hypoxantinfosforibozyltransferáza)

Podle nejnovějších údajů je u Cushingovy choroby vhodným lékem pasireotid, kterým se po půlroční léčbě podařilo normalizovat hladiny UFC u 15–26 % pacientů v závislosti na dávce [Feelders et al. 2013]. Proto byl v listopadu 2012 doporučen americkým výborem Food and Drug Administration's Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee pro léčbu Cushingovy choroby [Marek 2012]. Tento SA vykazuje nejvyšší afinitu k SSTR5. Dle našich výsledků byla u 4 z 9 pacientů (44 %) exprese SSTR5 nízká a u 3 z 9 osob (33 %) nulová. To mohlo být příčinou nízké odpovědi na medikamentózní léčbu a k rozhodnutí nádor odstranit chirurgicky.

U vzorků osob s Cushingovou chorobou jsme prokázali statisticky významně vyšší expresi D2R než SSTR2 a SSTR5. Medián relativních hodnot expresí oproti D2R byl u SSTR2 zhruba 20 krát nižší a u SSTR5 dokonce 500 krát nižší. Léčba pomocí DA (kabergolin) vede k normalizaci hladiny UFC u 35–40 % pacientů a redukce nádorové masy je pozorována u 20 % osob [Pivonello et al. 2009]. Vzhledem k faktu, že v našem souboru nebyly hodnoty exprese D2R nižší než jakéhokoliv SSTR, předpokládáme, že by léčba pomocí DA mohla být úspěšnější než v případě pasireotidu.

V receptorovém profilu KAA dle zahraničních studií dominuje D2R, SSTR3 a SSTR2 [Taboada et al. 2007, Cakir et al. 2010, Hofland et al. 2010, Nishioka et al. 2011]. Ke stejným výsledkům jsme dospěli i v našem souboru 144 pacientů s KAA, ve kterém exprese D2R a ER1 byly signifikantně vyšší oproti expresím SSTR. SSTR2 a SSTR3 byly statisticky významně vyšší než SSTR1, SSTR4 a SSTR5.

Soubor 144 KAA jsme podrobněji testovali z hlediska závislosti exprese receptorů na věku, pohlaví, místu uložení, směru růstu a imunohistochemické klasifikaci. Náš soubor tvořilo 68 žen a 76 mužů, medián roků u obou pohlaví byl 63. Žádný z testovaných receptorů nekoreloval s věkem pacientů ani nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v expresích receptorů mezi ženami a muži, a to ani v případě ER1. Důvodem byl zřejmě vysoký věk žen, z nichž většina byla postmenopauzální.

Ani v případě velikosti nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v expresích sedmi studovaných receptorů. Tento výsledek může být dán tím, že se u většiny nádorů jednalo o pomalu rostoucí makroadenomy. Nízké exprese SSTR byly popsány zejména u agresivně rostoucích nádorů [Jaquet et al. 1999]. Z hlediska extenze a invazivity adenomů do okolních prostor rozdělených dle Hardy-Wilsonovy klasifikace také nebyl potvrzen signifikantní rozdíl. Avšak z důvodu nehomogenního třídění adenomů do 7 základních skupin nelze tento výsledek jednoznačně klinicky zhodnotit.

Dle imunohistochemické analýzy byly KAA rozděleny do 6 tříd, přičemž největší z nich tvořily gonadotropní KAA. Při porovnávání expresí jednotlivých receptorů u různých histochemických typů se našly statisticky významně vyšší exprese ER1 a D2R u *null cell* tumorů oproti tichým ACTH adenomům. SSTR3 se významně více exprimoval u gonadotropních adenomů v porovnání s tichými ACTH adenomy .

Rozdíly byly shledány také při určování expresních profilů jednotlivých KAA. Charakteristickým rysem *null cell* tumorů byla dominance exprese D2R a signifikantně nízké exprese SSTR4 a SSTR5. Zajímavou skupinu z hlediska expresního profilu tvořily gonadotropní KAA. U téměř všech 7 vzájemně porovnávaných receptorů byly nalezeny

signifikantní rozdíly, výjimkou byly obdobné exprese SSTR2 s SSTR3 a SSTR4 s SSTR5. Exprese receptorů u gonadotropních KAA klesala v posloupnosti D2R>ER1>SSTR3>SSTR2>SSTR1. U tichých kortikotropních adenomů nebyl expresní profil tak různorodý jako u ACTH-secernujících adenomů a významně nižší hladinu vykazoval pouze SSTR4. Společným znakem funkčních a klinicky afunkčních ACTH-adenomů bylo široké rozpětí exprese SSTR5. U poslední skupiny zahrnující plurihormonální adenomy byl při porovnání s SSTR významněji více exprimován D2R, výjimkou byl pouze SSTR2.

Při hodnocení výsledků jsme vzájemně porovnávali exprese jednotlivých receptorů. V práci Nishioka et al. [2011] byla již dříve popsána korelace mezi ER1 a SSTR u souboru 59 vzorků KAA získaných od pacientů mladších 50 let. Korelační koeficienty se v závislosti na typu porovnávaných receptorů pohybovaly mezi 0,70 a 0,85. U starších pacientů se korelace nevyskytovaly. Náš soubor 144 KAA adenomů jsme vzhledem k mediánu 63 let a nepotvrzeným rozdílům v expresích jednotlivých receptorů v závislosti na věku a pohlaví nijak dále netřídili. Nejvyšší korelaci vykazoval D2R s ER1 ($r=0,686$). V tabulce 18 jsou vypsány všechny statisticky významné korelace. Je patrné, že naše data vykazují nižší stupeň korelace než naznačuje Nishioka et al. [2011].

Tabulka 18 Přehled statisticky významných korelací mezi SSTR, D2R a ER1

Typ receptorů	korelační koeficient (r)	statistická významnost (p)
D2R a ER1	0,686	<0,001
SSTR2 a ER1	0,510	<0,001
SSTR3 a D2R	0,349	<0,001
SSTR2 a D2R	0,316	<0,001
SSTR3 a ER1	0,229	0,006

V současné době se symptomatické KAA léčí transsfenoidální adenektomií. Avšak nejsou žádná jednoznačná doporučení, jak postupovat v případě recidivy onemocnění, ke které dochází u 13 % pacientů i po kompletním odstranění nádoru a u 41 % osob v případě pooperačního rezidua [Greenman et al. 2009b]. V práci Ferrante et al. [2006] autoři došli k závěru, že k opětovnému nárůstu adenomu z rezidua po radioterapii dochází v průběhu 8 let u stejného počtu případů jako v případě kompletní adenektomie. U pacientů s reziduem bez radioterapie byl růst pozorován 3 krát častěji. I Greenman et al. [2009a] potvrzuje, že

včasné zahájení léčby po operaci dosahuje výraznějších účinků. Při podávání DA ihned po operaci došlo k růstu rezidua v průběhu následujících 103 měsíců pouze u 10 % sledovaných. Pokud však byla léčba zahájena až v případě prokázaného růstu, byla léčba DA úspěšná jen u 61 % pacientů.

Naše práce obsahující 144 vzorků KAA představuje dosud největší soubor, jaký byl testován z hlediska komplexního stanovení exprese D2R, ER1 a 5 typů SSTR. Výsledky, které jsme získali statistickou analýzou, jsou ve většině případů v souladu s již dříve publikovanými pracemi, které byly provedeny s menším počtem probandů. U KAA byl nejvíce exprimovaným receptorem D2R, avšak jeho hladina byla signifikantně nižší v porovnání s prolaktinomy. Nedá se tedy předpokládat, že by podávání DA u KAA bylo tak úspěšné jako je tomu v případě PRL-sekretujících adenomů.

Naše práce tak svými výsledky podporuje provedení dalších prospektivních kontrolovaných studií zaměřených na zhodnocení léčby současnými i nově vyvíjenými hormonálními agonisty ve vztahu k expresi jednotlivých typů receptorů. Určování expresních profilů jednotlivých hypofyzárních nádorů se vzhledem k našim výsledkům jeví jako klinicky žádoucí.

7 Závěry

ad cíl 1)

Kalibrační standardy a kontroly byly vytvořeny z plazmidů pCR4 (Invitrogen) se zaklonovanými inzerty SSTR1–5, ER1 a D2R (Generi Biotech, Česká republika). Jednotlivé kalibrační body ($10^1 - 10^6$ kopií/ μ l) jsme získali naředěním výchozí koncentrace (10^7 kopií/ μ l) desítkovou řadou. Na základě vytvořených kalibračních křivek jsme pro všechny typy transkriptů přepočítávali hodnoty CT (cycle threshold) na hodnoty absolutních koncentrací a získali tak informaci o expresi stanovovaných receptorů v tkáni adenomů.

Pro komplexnější přehled receptorového profilu byla u adenomů hypofýzy sledována kromě SSTR a ER1 také exprese D2R.

ad cíl 2)

Pro maximální amplifikační účinnost kvantitativní real time PCR jsme na základě validačních protokolů zvolili optimální koncentraci primerů (300 nM) a sond (200 nM) v Master mixu. Podmínky nejúčinnější amplifikace na přístroji RotorGene 6000 (Corbett): úvodní denaturace (50 °C 2 min, 95 °C 10 min) pokračovala 50 cykly, které se skládaly z 15 s denaturace při 95 °C s následným annealingem a extenzí při 60 °C 1 min.

ad cíl 3)

U soubor 144 KAA jsme testovali závislosti expresí receptorů na věku, pohlaví, místu uložení a směru růstu. U žádných z těchto parametrů nebyla nalezena signifikantní korelace. Dle imunohistochemické analýzy byly KAA rozděleny do 6 skupin: *null cell* tumory (n=10) gonadotropní KAA (n=108), tiché ACTH tumory (n=12), plurihormonální tumory (n=10), akromegalie klinicky neprokázané (n=2) a neprokázané prolaktinomy (n=2).

ad cíl 4)

Analoga receptorů nejsou v současné době v ČR k léčbě KAA schváleny, limitací je absence prospektivních studií s medikamentózní léčbou KAA na podkladě profilu exprese jednotlivých receptorů, i když je snaha tento postup zavést.

ad cíl 5)

V současné době jsou připraveny veškeré protokoly a standardní operační postup zahrnující přípravu vzorku, izolaci RNA, reverzní transkripci a real time PCR.

8 Použitá literatura

ABDELMANNAN, D. et al. Incidentally Discovered Pituitary Masses: Pituitary Incidentalomas. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2010, 5 (02), 253–264. ISSN: 1744-665.

ABOSCH, A. et al. Transsphenoidal microsurgery for growth hormone-secreting pituitary adenomas: initial outcome and long-term results. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83 (10), 3411–3418. ISSN: 0021-972X.

ANDERSEN, M. et al. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol.* 2001, 54 (01), 23–30. ISSN: 0300–0664.

ARAFAH B. M. et al. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer.* 2001, 8 (4), 287–305. ISSN 1351–0088.

ASA, S. L. The role of hypothalamic hormones in the pathogenesis of pituitary adenomas. *Pathol Res Pract.* 1991, 187 (05), 581–583. ISSN: 0344-0338.

ASA, S. L. et al. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2 (11), 836–849. ISSN: 1474-175X.

BARBIERI, F. et al. Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm. *Int J Pept.* 2013, (926295) Epub 2013 Feb 7. eISSN: 1687-9775.

BARNETT, P. Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine.* 2003, 20 (3), 255-264. ISSN: 1355-008X.

BAUER, W. et al. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci.* 1982, 31 (11), 1133-1140. ISSN: 0024-3205.

BEN-SHLOMO, et al. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2010, 21 (03). 123–133. ISSN: 1043-2760.

BJÖRNSTRÖM, L. et al. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005, 19 (04), 833–842. ISSN: 0888–8809.

BLUM, A.M. et al. Granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors and respond to somatostatin with decreased IFN-g secretion. *J Immunol.* 1992, 149 (11), 3621–3626. ISSN: 0022-1767.

BOCCI, G. et al. In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. *Eur J Clin Invest.* 2007, 37 (09), 700–708. ISSN: 0014-2972.

BOKUM, A.M. et al. Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. *Eur Cytokine Netw.* 2000, 11 (02), 161–176. ISSN: 1148-5493

BREEN, P. et al. Radiotherapy for nonfunctional pituitary adenoma: analysis of long-term tumor control. *J Neurosurg.* 1998, 89 (06), 933–938. ISSN: 0022-3085.

BROCHIER, S. et al. Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients. *Eur J Endocrinol.* 2010, 163 (2), 193–200. ISSN 0804–4643.

BRUNOVÁ, J. Diagnostika a terapie poruch funkce štítné žlázy. *Med Praxi.* 2008, 5 (09), 315–321. ISSN: 1214-8687.

BURGUS, R. et al. Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973, 70 (3), 684–688. ISSN: 0027-8424.

CAKIR, M. et al. Somatostatin receptor biology in neuroendocrine and pituitary tumours: part 2-clinical implications. *J Cell Mol Med.* 2010, 14 (11) 2585-2591. ISSN: 1582-1838.

CBTRUS (2012). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008 (March 23, 2012 Revision). Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. website: www.cbtrus.org.

COLAO, A. Prolactinomas resistant to standard dopamine agonists respond to chronic cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82 (03) 876–883. ISSN: 0021-972X.

COLAO, A. et al. Combined therapy of somatostatin analogues and dopamine agonists in the treatment of pituitary tumours. *Eur J Endocrinol.* 2007, 156 (01), 57-63. ISSN: 0804-4643.

COLAO, A. et al. Medical treatment for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer.* 2008, 15 (4), 905–915. ISSN 1351–0088.

COLAO, A. et al. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009, 10 (02), 111–123. ISSN 1389–9155.

COLAO, A. et al. Pituitary carcinomas. *Front Horm Res.* 2010, 38, 94-108. ISSN: 0301-3073.

COLAO, A. et al. Resistance to somatostatin analogs in acromegaly. *Endocr Rev.* 2011, 32 (02), 247–271. ISSN: 0163-769X.

COMTOIS, R. et al. The clinical and endocrine outcome to transsphenoidal microsurgery of nonsecreting pituitary adenomas. *Cancer.* 1991, 68 (04), 860–866. ISSN: 0008-543X.

COSTELLO, R.T. Subclinical Adenoma of the Pituitary Gland. *Am J Pathol.* 1936, 12 (02), 205–216. ISSN: 0002-9440.

ČESÁK, T. et al. Longitudinální sledování růstu pooperačních reziduí afunkčních adenomů hypofýzy. *Cesk Slov Neurol N.* 2009, 72/105 (02), 115–124. ISSN 1210–7859

DALY, A.F. et al. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91 (12)4769–4775. ISSN: 0021-972X.

DALY, A. F. et al. The epidemiology and management of pituitary incidentalomas. *Horm Res.* 2007, 68 (05), 195–198. ISSN: 0301-0163.

DANIEL, E. et al. Diagnosis of Cushing's disease. *Pituitary.* 2015, 18 (02), 206–210. ISSN 1573–7403

DAVIS, J. R. E. et al. Gene therapy for pituitary tumours. *Endocr Relat Cancer.* 1999, 6 (4), 475–481. ISSN 1351–0088.

DAVIS, J. R, et al. Pituitary tumours. *Reproduction.* 2001, 121 (03), 363–371, ISSN: 1470-1626.

DE BRUIN, C. et al. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009, 94 (04), 1118-1124, ISSN: 0021-972X.

DEKKERS, O. M. et al. Observation alone after transsphenoidal surgery for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91 (05), 1796–1801. ISSN: 0021-972X.

DEKKERS, O.M. et al. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008, 93 (10), 3717–3726. ISSN 0021–972X.

DELELLIS R.A. et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon: IARC Press, 2004. ISBN 92-832-2416-7.

DELMAS, P.D. et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1997, 337 (23), 1641–1647. ISSN: 0028-4793.

DEUPI, X. et al. Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem.* 2007, 74, 137–166. ISSN: 0065-3233.

DEVNATH, S. et al. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol.* 2008, 20 (06), 687–691. ISSN: 0953-8194.

DJORDJIJEVIC, D. et al. Effect of 17beta-estradiol on somatostatin receptor expression and inhibitory effects on growth hormone and prolactin release in rat pituitary cell cultures. *Endocrinology.* 1998, 139 (05), 2272-2277. ISSN: 0013-7227.

DWORAKOWSKA, D. et al. The molecular pathogenesis of corticotroph tumours. *Eur J Clin Invest.* 2012, 42 (06), 665–676. ISSN: 0014-2972.

ELLIOTT, D.E., Blum, A.M., Li, J., et al. Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J Immunol.* 1998, 160 (08), 3997–4003. ISSN: 0022-1767.

ENMARK, E. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82 (12), 4258–4265. ISSN: 0021-972X.

EZZAT, S. et al. Acromegaly. Clinical and biochemical features in 500 patients. *Medicine.* 1994, 78, 233–240. ISSN 0025–7974.

EZZAT, S. et al. Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2002, 109 (01), 69–78. ISSN: 0021-9738.

EZZAT, S. et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer.* 2004, 101 (03), 613–619. ISSN: 0008-543X.

EZZAT, S. et al. Mechanisms of Disease: The Pathogenesis of Pituitary Tumors. *Shereen Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006, 2 (04), 220–230. ISSN: 1745-8366.

FAGLIA, G. Epidemiology and pathogenesis of pituitary adenomas. *Acta Endocrinol.* 1993, 129 (01), 1–5. ISSN: 0001-5598.

FEELDERS, R. A. et al. Medical treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013, 98 (02), 425–438. ISSN: 0021-972X.

FEIGENBAUM, S. L. et al. Transsphenoidal pituitary resection for preoperative diagnosis of prolactin-secreting pituitary adenoma in women: long term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81 (05), 1711–1719. ISSN: 0021-972X.

FERNANDEZ-BALSELLS, M.M. et al. Natural History of Pituitary Incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96 (04), 905–912. ISSN: 0021-972X

FERONE, D. et al. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol.* 2009, 42 (05), 361–370. ISSN: 0952-5041.

FERRANTE, E. et al. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol.* 2006, 155 (6), 823–829. ISSN 0804–4643.

FONG, M. Y. et al. Tumorigenic potential of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in vivo investigated using a transgenic mouse model, and effects of cross breeding with p53 (+/-) transgenic mice. *BMC Cancer.* 2012, 12. eISSN: 1471-2407.

FREDA, P.U. et al. Pituitary Incidentaloma: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96 (04), 894–904. ISSN: 0021-972X

FRYŠÁK, Z. et al. Akromegalie –současné limity léčby. *Interní med.* 2009,11 (05), 221–223. ISSN 1212–7299.

GABALEC, F. et. al. Farmakologická léčba tumorů hypofýzy. *Prakt lékařn.* 2014. 10 (05). 174–176. ISSN: 1801-2434.

GITTOES, N.J. et al. Radiotherapy for nonfunctioning pituitary tumours. *Clin Endocrinol*. 1998, 48 (3), 331–337. ISSN: 0300-0664.

GORCZYCA, W. et al. Microadenomas of the human pituitary and their vascularization *Neurosurgery*. 1988, 22 (01), 1–6. ISSN: 0148-396X

GOSDEN, J.R. et al. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1986, 43 (3–4), 218–220. ISSN: 0301-0171.

GREENE, G.L. et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986, 231 (4742), 1150–1154. ISSN: 0036–8075.

GREENMAN, Y. et al. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009a, 23(5), 625–638. ISSN 1521–690X.

GREENMAN, Y. et al. How should a nonfunctioning pituitary macroadenoma be monitored after debulking surgery? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009b, 70(6), 829–832. ISSN 0300–0664.

GUILLERMET-GUIBERT, J. et al. Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest*. 2005a, 28 (11 Suppl. International), 5–9. ISSN: 0391-4097.

GUILLERMET-GUIBERT J. et al. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: molecular aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005b, 19 (04), 535–551. ISSN: 1521-6918.

GUOMUNDSSON, K. R. A survey of tumors of the central nervous system in Iceland during the 10-year period 1954-1963. *Acta Neurol Scand*. 1970, 46 (04), 538–552. ISSN: 0001-6314.

HALL, J.M. et al. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001, 276 (40), 36869–36872. ISSN: 0021-9258.

HÁNA, V. Onemocnění předního laloku hypofýzy. *Postgraduální med.* 2013, 15 (07), 710–718. ISSN 1212–4184.

HÁNA, V. et al. Registr selárních tumorů – RESET: diagnostika a léčba akromegalie v České a Slovenské republice v 21. století. *Diabetol. metab. endokrinol. výživ.* 2013b, 16 (04), 219–224. ISSN 1211–9326

HARDY, J. Transphenoidal microsurgery of the normal and pathological pituitary. *Clin Neurosurg.* 1969, 16, 185–217. ISSN: 0069-4827.

HAYRY, P. et al. Somatostatin analog Lanreotide inhibits myocyte replication and several growth factors in allograft arteriosclerosis. *FASEB J.* 1993, 7 (11), 1055–1060. ISSN: 0892-6638.

HELDRING, N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007, 87 (03), 905–931. ISSN: 0031–9333.

HERLANT, M. Introduction. In: Tixier-Vidal, A. *Ultrastructure in biological systems. The Anterior Pituitary.* New York: Elsevier, 2013. eISBN: 9781483273945.

HOFLAND, L.J. et al. Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy. *Front Horm Res.* 2004, 32, 235–252. ISSN: 0301-3073.

HOFLAND, L. J. et al. Pituitary tumours: the sst/D2 receptors as molecular targets. *Mol Cell Endocrinol.* 2010, 326 (1-2), 89-98 ISSN: 0303-7207.

CHATZELLIS, E. et al. Aggressive Pituitary Tumors. *Neuroendocrinology.* 2015 Jan 5 [Epub ahead of print]. eISSN: 1423-0194.

CHANDLER, W. F. et al. Treatment of pituitary tumors: a surgical perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008, 37 (01), 51–66. ISSN: 0889-8529.

CHESNOKOVA, V. et al. Pituitary Senescence: The Evolving Role of *Pttg*. *Mol Cell Endocrinol*. 2010, 326 (01-02), 55–59. ISSN: 0303-7207.

JAGANNATHAN, M.D. et al. Genetics of Pituitary Adenomas: Current Theories and Future Implications. *Neurosurg Focus*. 2005, 19 (05). eISBN: 1092-0684.

JANECKA, A. et al. Somatostatin analogs. *J Pept Res*. 2001, 58 (02), 91-107. ISSN: 1397-002X.

JAQUET, P. et al. Quantitative and functional expression of somatostatin receptor subtypes in human prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999, 84 (09), 3268-3276. ISSN: 0021-972X.

JEZKOVÁ, J. et al. Gamma knife radiosurgery for acromegaly-long-term experience. *Clin Endocrinol*. 2006, 64 (05), 588–595. ISSN: 0300-0664.

JISKRA, J. *Poruchy štítné žlázy. Praktický přehled nejen pro laickou veřejnost*. Praha: Mladá fronta a.s., 2011. ISBN 978–80–204–2456–3.

JORDAN, S. et al. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *Eur J Endocrinol*. 2000, 143 (01), R1–6. ISSN: 0804-4643.

KATZNELSON, L. et al. Clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993, 76 (05), 1089–1094. ISSN: 0021-972X.

KOVACS, K. et al. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2001, 54 (02), 121–127. ISSN: 0167-594X.

KRANTIC, S. et al. Novel modalities of somatostatin actions. *Eur J Endocrinol*. 2004, 151 (06), 643–655. ISSN: 0804-4643.

KREMER, P. et al. Magnetic resonance imaging after transsphenoidal surgery of clinically non-functional pituitary macroadenomas and its impact on detecting residual adenoma. *Acta Neurochir*. 2002, 144 (05), 433–443. ISSN: 0001-6268.

KRŠEK, M. Hyperprolaktinémie a prolaktinomy. *Interní med.* 2002, 4 (11), 530–536. ISSN 1212–7299.

KRŠEK, M. Akromegalie a gigantismus. *Postgraduální med.* 2011, 13 (04), 360–367. ISSN 1212–4184.

KRŠEK, M. Onemocnění kůry nadledvin. *Postgraduální med.* 2013, 15 (07), 741–750. ISSN 1212–4184.

KRULICH, L. et al. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology.* 1968, 83 (4), 783–790. ISSN: 0013-7227.

KUIPER, G.G. et al. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 1998, 19 (04), 253–86. ISSN: 0091-3022.

KUMAR, R. et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids.* 2011, 2011, ID 812540. doi: 10.4061/2011/812540. Epub 2011 Jul 26. eISSN: 2090-0112.

LAMBERTS, SW. et al. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev.* 1990, 70 (2), 279-318. ISSN: 0031-9333.

LESTER, SA. The pathology of pituitary adenomas. In: Kalmon, D. *The Pituitary Adenoma.* New York: Springer Science & Business Media, 2013. eISBN: 978-1-4684-3668-6.

LISCÁK, R. ET AL. Gamma knife radiosurgery for endocrine-inactive pituitary adenomas.. *Acta Neurochir.* 2007, 149 (10), 999–1006. ISSN: 0001-6268.

LLOYD, R.V. et al. Effects of estrogens on pituitary cell and pituitary tumor growth. *Pathol Res Pract.* 1991, 187 (05), 584–586. ISSN: 0344-0338.

LOVASTE, M.G. et al. Epidemiology of primary intracranial neoplasms. Experiment in the Province of Trento, (Italy), 1977-1984. *Neuroepidemiology*. 1986, 5 (04), 220–232. ISSN: 0251-5350.

LULLMANN-RAUCH, R. *Histologie*. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN: 978-80-247-3729-4.

MAČÁK, J. et al. *Patologie*. Praha: Grada Publishing, 2012. eISBN: 978-80-247-2770-2.

MAREK, J. et al. Incidentalomy v endokrinologii–Hypofýza. *Interní med*. 2001, 3 (08), 358–362. ISSN 1212–7299.

MAREK, J. Kam kráčíš hypofýzo. *Vnitř Lék*. 2007, 53 (07-08), 789–794. ISSN: 0042-773X

MAREK, J. Hyperprolaktinémie v praxi. *Interní med*. 2008, 10 (12), 549–554. ISSN 1212–7299.

MAREK, J. Pasireotid-nová možnost v léčbě Cushingovy choroby. *Diabetol. metab. endokrinol. výživ*. 2012, 15 (04), 245-249. ISSN: 1211-9326.

MCCORMICK, W. F. et al. Absence of chromophobe adenomas from a large series of pituitary tumors. *Arch Pathol*. 1971, 92 (04), 231–238. ISSN: 0363-0153.

MCLENDON, R.E. et al. *Russell & Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System*. New York: CRC Press, 2006. eISBN: 9780340810071

MELMED, S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003, 112 (11), 1603–1618. ISSN: 0021-9738.

MELMED, S. Update in pituitary disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008, 93 (2), 331–338. ISSN: 0021-972X.

- MESTRON, A. et al. Epidemiology, clinical characteristics, outcome, morbidity and mortality in acromegaly based on the Spanish Acromegaly Registry (Registro Espanol de Acromegalia, REA). *Eur J Endocrinol*. 2004, 151, 439–446. ISSN 0804–4643.
- MILLER, GM. et al. Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995, 80 (04), 1386–1392. ISSN: 0021-972X.
- MINNITI, G. et al. Radiotherapy for nonfunctioning pituitary adenomas: from conventional to modern stereotactic radiation techniques. *Neurosurg Rev*. 2007, 30 (03), 167–175. ISSN: 0344-5607.
- MODLIN, I.M. et al. Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010, 31 (02), 169–188. ISSN: 0269-2813.
- MOLITCH, M.E. Pituitary tumors and pregnancy. *Growth Horm IGF Res*. 2003, 13 (Suppl A), S38–44. ISSN: 1096-6374.
- MOLITCH, M. E. Pharmacologic resistance in prolactinoma patients. *Pituitary*. 2005, 8 (01) 43–52. ISSN: 1386-341X.
- MOLITCH, M. E. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008, 37 (1), 151–171. ISSN: 0889-8529.
- MONSON, J.P. The epidemiology of endocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2000, 7 (01), 29–36. ISSN: 1351-0088.
- MOORE, D. A conversation with Elwood Jensen. *Annu Rev Physiol*. 2012, 74, 1–11. ISSN: 0066–4278.
- MOREIRA, I.S. Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1840 (01): 16–33. ISSN: 0006-3002.

MOSSELMAN, S. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996, 392 (01), 49–53. ISSN: 0014-5793.

NAYLOR, S.L. et al. Polymorphic human somatostatin gene is located on chromosome 3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983, 80 (9), 2686-2689. ISSN: 0027-8424.

NETUKA, D. et al. Léčba adenomů hypofýzy. *Cesk Slov Neurol N.* 2011, 74/107 (03), 240–253. ISSN 1210–7859

NEWELL-PRICE, J. et al. Differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Arg Bras Endocrinol Metabol.* 2007, 51 (08), 1199–1206. ISSN 0004–2730.

NIELSEN, S. et al. Expression of somatostatin receptors on human pituitary adenomas in vivo and ex vivo. *J Endocrinol Invest.* 2001, 24 (06), 430-437. ISSN: 0391-4097.

NILSSON, B. et al. Pituitary adenomas in Sweden between 1958 and 1991: incidence, survival, and mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85 (04), 1420–1425. ISSN: 0021-972X.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001, 81 (04), 1535–1565. ISSN: 0031-9333.

NISHIOKA, H. et al. Co expression of somatostatin receptor subtypes and estrogen receptor- α mRNAs by non-functioning pituitary adenomas in young patients. *Mol Cell Endocrinol.* 2011, 331 (01), 73-78. ISSN: 0303-7207.

NOMIKOS, P. et al. Impact of primary surgery on pituitary function in patients with non-functioning pituitary adenomas—a study on 721 patients. *Acta Neurochir.* 2004, 146 (01), 27–35. ISSN: 0001-6268.

PARK, P. et al. The role of radiation therapy after surgical resection of nonfunctional pituitary macroadenomas. *Neurosurgery.* 2004, 55 (01), 100–106; discussion 106–107. ISSN: 0148-396X.

PARTSCH, C.-J. et al. *Endokrinologische Funktions diagnostik*. Kiel: Schmidt & Klaunig Verlag, 2005.128. ISBN 3-88312-130-4.

PATEL, Y. C. General aspects of the biology and function of somatostatin. In: Weil, C., et al. *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*. Berlin: Springer-Verlag, 1992, 4, 1-16. ISBN: 978-3-540-54569-9.

PATEL, Y.C. et al. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: Tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993, 192 (01), 288-294. ISSN: 0006-291X.

PATEL, Y.C. et al. The somatostatin receptor family. *Life Sci*. 1995, 57 (13), 1249-1265. ISSN: 0024-3205.

PATEL, Y. C. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest*. 1997, 20 (06), 348-367. ISSN: 0391-4097.

PATEL, Y. C. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 1999a, 20 (3), 157-198. ISSN: 0091-3022.

PATEL, Y.C. et al. Production, action, and degradation of somatostatin. In: Jefferson, L.S., et al. *The Handbook of Physiology, The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*. New York: Oxford Univ. Press, 1999b. ISBN: 9780470650714

PERCY, A.K. et al. Neoplasms of the central nervous system. Epidemiologic considerations. *Neurology*. 1972, 22 (01), 40-48. ISSN: 0028-3878.

PEREZ-CASTRO, C. et al. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev*. 2012, 92 (01), 1-38. ISSN: 0031-9333.

PETERSENN, S. et al. Therapy of endocrine disease: Outcomes in patients with Cushing's disease undergoing transsphenoidal surgery: systematic review assessing criteria used to

define remission and recurrence. *Eur J Endocrinol.* 2015, 172 (06) R227–R239; Epub 2015 Jan. eISSN: 1479-683X.

PIETRAS, R.J. et al. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J.* 1980, 191 (03), 743–760. ISSN: 0264-6021.

PISAREK, H. et al. Expression of somatostatin receptor subtypes in human pituitary adenomas - immunohistochemical studies. *Endokrynol Pol.* 2009, 60 (04), 240-251. ISSN: 0423-104X.

PISAREK, H. et al. Expression of somatostatin receptor subtypes in primary and recurrent gonadotropinomas: are somatostatin receptors involved in pituitary adenoma recurrence? *Neuro Endocrinol Lett.* 2011, 32 (01), 96-101. ISSN: 0172-780X.

PIVONELLO, R. et al. Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol.* 2007, 156 (01), S13-21. ISSN: 0804-4643.

PIVONELLO, R. et al. The medical treatment of Cushing's disease: effectiveness of chronic treatment with the dopamine agonist cabergoline in patients unsuccessfully treated by surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009, 94 (01), 223-30. ISSN: 0021-972X

PIVONELLO, R. et al. Pasireotide Treatment Significantly Improves Clinical Signs and Symptoms in Patients With Cushing's Disease: Results From a Phase III Study. *Clin Endocrinol.* 2014, 81(03), 408–417. ISSN 0300-0664.

PRADAYROL, L. et al. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.* 1980, 109 (1), 55-58. ISSN: 0014-5793.

QUEREDA, V. et al. Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol.* 2009, 42 (02), 75–86. ISSN: 0952-5041.

QUINTELA, M. et al. Transforming growth factor-betas inhibit somatostatin messenger ribonucleic acid levels and somatostatin secretion in hypothalamic cells in culture. *Endocrinology.* 1997a, 138 (10), 4401–4409. ISSN: 0013-7227.

QUINTELA, M. et al. Leptin inhibits in vitro hypothalamic somatostatin secretion and somatostatin mRNA levels. *Endocrinology*. 1997b, 138 (12), 5641–5644. ISSN: 0013-7227.

RENNER, U. et al. Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998, 83 (04), 1368-1375. ISSN: 0021-972X.

REISINE, T. et al. Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience*. 1995, 67 (04), 777-790. ISSN: 0306-4522.

ROCHEVILLE, M. et al. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*. 2000, 275 (11), 7862–7869. ISSN: 0021-9258.

ROCHEVILLE, M. et al. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*. 2000, 288 (5463), 154–157. ISSN: 0036-8075.

ROUSSEL-GERVAIS, A. et al. Cooperation between cyclin E and p27(Kip1) in pituitary tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 2010, 24 (09), 1835–1845. ISSN: 0888-8809.

SCANGAS, G. A. et al. Pituitary incidentalomas. *Pituitary*. 2014, 17 (05), 486–491. ISSN: 1386-341X.

SHEEHAN, J. M. et al. Radiosurgery for Cushing's disease after failed transsphenoidal surgery. *J Neurosurg*. 2000, 93 (05), 738–742. ISSN: 0022-3085.

SHEEHAN, J. P. et al. Stereotactic radiosurgery for pituitary adenomas: an intermediate review of its safety, efficacy, and role in the neurosurgical treatment armamentarium. *J Neurosurg*. 2005, 102 (04), 678–691. ISSN: 0022-3085.

SHEN, L.P. et al. Human somatostatin I: sequence of the cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982, 79 (15), 4575-4579. ISSN: 0027-8424.

SHEPPARD, M. et al. Metabolic clearance and plasma half-disappearance time of exogenous somatostatin in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979, 48 (01), 50-53. ISSN: 0021-972X.

SHERIDAN, M. A. et al. Structure-function relationships of the signaling system for the somatostatin peptide hormone family. *American Zoologist*, 2000, 40.2: 269–286. ISSN: 0003-1569.

SCHONBRUNN, A. et al. Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem.* 1978, 253 (18), 6473–6483. ISSN: 0021-9258.

SCHUSSLER, N. et al. Effect of the slow-release formulation of somatuline (BIM 23014) on estrogen-induced hyperprolactinemia and lactotroph hyperplasia in the female rat. *Neuropeptides.* 1994, 26 (06), 399-404. ISSN: 0143-4179.

SCHWESINGER, G. et al. Hyperplasias and adenomas of the pituitary gland in an unselected autopsy material. *Zentralbl Allg Pathol.* 1982, 126 (05–06), 495–498. ISSN: 0044-4030.

SLABÝ, O. et al. Význam profilů genové exprese somatostatinových receptorů SSTR1-SSTR5 v odpovědi pacientů s neuroendokrinními tumory na léčbu somatostatinovými analogy. Poster na XXXIII. Brněnských onkologických dnech, Brno, 16.-18. 4. 2009. In: *Edukační sborník*. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2009. ISBN: 978-80-86793-23-8

SLAMĚNÍK, M. Centrální tyreotoxikóza a non-compliance. *Interní Med.* 2006, 7 a 8, 358–359. ISSN: 1212-7299.

SURAWICZ, T.S. et al. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol.* 1999, 1 (01), 14–25. ISSN: 1522-8517.

SUSINI, C. et al. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol.* 2006, 17 (12), 1733–1742. ISSN: 0923-7534.

ŠPIČÁK, J. Somatostatin a jeho využití. *Gastroent Hepatol.* 2012, 66 (6), 458-464. ISSN: 1804-7874.

TABOADA, G. F. et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1 – 5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2007, 156 (1), 65–74. ISSN: 0804-4643.

TABOADA, G. F. et al. 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 (03), 295-303. 0804-4643.

TAKEDA, J. et al. Localization of human somatostatin receptor 5 gene (SSTR5) to chromosome band 16p13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1995, 26 (03), 638-639. ISSN: 0888-7543.

THAPAR, K. et al. *Diagnosis and Management of Pituitary Tumors.* New York: Springer Science & Business Media, 2000. eISBN: 978-1-59259-217-3.

UEI, Y. et al. Incidental adenomas of the human pituitary gland. *Endocr Pathol.* 1994, 5 (02), 90–99. ISSN: 1046-3976.

VALDEMARSSON, S. et al. Early postoperative growth hormone levels: high predictive value for long-term outcome after surgery for acromegaly. *J Intern Med.* 2000, 247 (06), 640–50. ISSN: 0954-6820

VAN DER HOEK, J. et al. Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005, 289 (02), E278-287. ISSN: 0193-1849.

VAN DER HOEK, J., Lamberts, SW., Hofland, LJ. Preclinical and clinical experiences with the role of somatostatin receptors in the treatment of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2007, 156 (01), 45–51. ISSN: 0804-4643.

VAN DER PAS, R. et al. Preoperative normalization of cortisol levels in Cushing's disease after medical treatment: consequences for somatostatin and dopamine receptor subtype expression and in vitro response to somatostatin analogs and dopamine agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 98 (12), E1880-1890. ISSN: 0021-972X

VANETTI, M. et al. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett.* 1992, 311 (03), 290-294. ISSN: 0014-5793.

VISSER-WISSELAAR, H.A. et al. 17-Beta-estradiol- dependent regulation of somatostatin receptor subtype expression in the 7315b prolactin secreting rat pituitary tumor in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 1997, 138 (03), 1180–1189. ISSN: 0013-7227.

WALSH, J. P. et al. Hyperprolactinaemia in males: a heterogenous disorder. *Aust.N.Z. J. Med.* 1997, 27 (04), 385–390. ISSN 0004-8291.

WALTER, P. et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985, 82 (23), 7889–7893. ISSN: 0027–8424.

WEBSTER, J. et al. A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline Comparative Study Group. *N Engl J Med.* 1994, 331 (14), 904–909. ISSN: 0028-4793.

YAMADA, Y. et al. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89 (01), 251-255. ISSN: 0027-8424.

YAMADA, Y. et al. Human somatostatin receptor genes: localization to human chromosomes 14, 17 and 22 and identification of simple tandem repeat polymorphisms. *Genomics.* 1993, 15 (02), 449-452. ISSN: 0888-7543.

YASUDA, K. et al. Human somatostatin receptor genes: localization of SSTR5 to human chromosome 20p11.2. *Genomics.* 1993, 17 (03), 785-786. ISSN: 0888-7543.

ZABEL, B.U. et al. High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983, 80 (22), 6932-6936. ISSN: 0027-8424.