

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



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

**Monika Drastíková**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Klinická biochemie**

**Hradec Králové**

**2015**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Klinická biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a FN v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Monika Drastíková  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
LF UK a FN v Hradci Králové

Školitel: Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky,  
LF UK a FN Hradec Králové

Školitel konzultant: Prof. MUDr. Jan Čáp, CSc.  
IV. interní hematologická klinika  
LF UK a FN Hradec Králové

Oponenti: Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc.  
Katedra radiologie a toxikologie  
Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity  
  
Doc. MUDr. Zdeněk Fryšák, CSc.  
III. interní klinika - nefrologická, revmatologická a endokrinologická  
Fakultní nemocnice Olomouc

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby disertačních prací Klinické biochemie dne 3.9.2015 v posluchárně Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, 4. patro, FN Hradec Králové od 14 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantů:

Grantová agentura UK (grant č. 723912)  
IGA NT 11344–4/2010

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v  
doktorském studijním programu Klinická biochemie

1. Obsah .....	2
2. Souhrn .....	3
3. Summary .....	4
4. Úvod do problematiky .....	5
4.1. Charakteristika adenomů hypofýzy .....	6
4.2. Struktura somatostatinových receptorů .....	7
4.3. Somatostatinová analoga .....	7
4.4. Terapeutický efekt somatostatinových analog .....	9
4.5. Modulátory estrogenových receptorů .....	9
5. Cíle disertační práce .....	10
6. Materiál a metodika .....	11
7. Výsledky .....	12
8. Diskuse .....	13
9. Závěry .....	17
10. Použitá literatura .....	18
11. Přehled publikačních činností .....	23
11.1. Původní vědecké publikace s impact factorem .....	23
11.2. Ostatní publikace v časopisech s impact factorem.....	24
11.3. Původní vědecké práce v časopisech bez IF .....	24
11.4. Ostatní publikace v časopisech bez IF.....	25
11.5. Přednášky .....	25
11.6. Postery .....	25

## 2. Souhrn

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

Převážná většina hypofyzárních nádorů jsou benigní adenomy, z nichž 25–30 % tvoří klinicky afunkční adenomy (KAA). Léčbou první volby je u KAA transsfenoidální neurochirurgická operace, která však jen málokdy vede k úplnému odstranění adenomu a často zůstává přítomno reziduum nádoru. Tento fakt vedl k rozvoji nových farmakologických přístupů na bázi somatostatinových analog (SA) a modulátorů estrogenových receptorů (ER).

SA jsou účinné u akromegalie, neuroendokrinních tumorů a Cushingovy choroby. Na druhou stranu, farmakologická léčba KAA většinou úspěšná nebývá. Nízká účinnost SA zde může souviset s variabilní expresí cílových receptorů. Cílem práce je určit expresní profily somatostatinových (SSTR typy 1–5) a estrogenových receptorů 1 (ER1). Pro kompletní přehled byly též u adenomů sledovány exprese dopaminového receptoru 2 (D2R).

#### Experimentální část

Skupina pacientů se skládala ze 105 mužů a 101 žen (20–87 roků, medián 61 roků). 144 vzorků představovalo KAA, 44 vzorků pocházelo od osob s akromegalií, 9 vzorků od osob s Cushingovou chorobou, 6 prolaktinomů a 3 TSH adenomy. Exprese receptorů byla stanovena pomocí kvantitativní real time PCR a získané výsledky byly normalizovány vůči expresi housekeepingového genu GUS (beta-glukuronidáza).

#### Výsledky

Neprokázali jsme signifikantní korelaci mezi expresí studovaných receptorů a pohlavím, věkem v okamžiku diagnózy, velikostí tumoru ani směrem infiltrace adenomu. Obecně nejvyšší expresi ve všech typech tumorů měly D2R a ER1. Signifikantně vyšší exprese D2R byly nalezeny u prolaktinomů a u Cushingovy choroby. Ostatní receptory byly u nádorů hypofýzy z hlediska exprese velmi heterogenní.

#### Závěry

Naše výsledky týkající se exprese SSTR, ER1 a D2R poukazují na individuální expresní profily jednotlivých typů hypofyzárních adenomů a také na velkou biologickou variabilitu receptorů u těchto nádorů s dominantní expresí D2R a ER1. Tento závěr komplikuje možnost paušálního podání SA osobám s KAA. Určení expresního profilu každého nádoru by v tomto případě mohlo pomoci v predikci efektivního dávkování SA u osob s KAA.

### 3. Summary

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

The overwhelming majority of pituitary tumors are benign, with 25–30% of them representing clinically non-functioning pituitary adenomas (NFA). The treatment of choice for NFA is transsphenoidal neurosurgery. However, the procedure is often not completely successful and frequently tumor remnants remain, resulting in regrow over the long-term follow-up period. This fact has led to the development of new therapy strategies using pharmacological treatment: somatostatin analogs (SA) and estrogen receptor modulators. SA are effectively used in the treatment of acromegaly, neuroendocrine tumors and Cushing's disease. In contrast, pharmacological treatment of NFA has for the most part been unsuccessful. Low SA effectiveness could be associated with the variable expression of target receptors on the adenomas. The aim of the study was to determine the somatostatin (SSTR subtypes 1–5) and estrogen receptor 1 (ER1) expression profile. To obtain more complex receptor profile expression in the pituitary, we also investigated dopamin receptor 2 (D2R).

#### Methods

The group of patients was made up of 105 men and 101 women (20–87 years old; median 61). 144 samples were NFA, 44 growth hormone secreting (GHomas), 9 corticotrophin secreting (ACTHomas), 6 prolactin secreting (PRLomas) and 3 thyrotropin secreting adenomas (TSHomas). The receptor expression was determined by quantitative real time PCR and the results obtained were normalized to the beta-glucuronidase housekeeping gene.

#### Results

We did not find any correlation between the receptor secretion profile and gender, age, tumor size or extension. Generally, the most expressed receptors in all adenoma types were D2R and ER1. Significantly high D2R expression was found in PRLomas and ACTHomas. The other receptor profiles were very heterogeneous.

#### Conclusions

Our molecular biology data on SSTR, ER1 and D2R revealed individual expression profiles. It demonstrates the extensive biological variability of the receptors in human's pituitary adenomas, with D2R and ER1 expression dominant. This fact makes treatment of NFA individual and very difficult. Determining the expression profile of receptors could serve to predict the SA dosage and increase the effectiveness of NFA treatment.

#### 4. Úvod do problematiky

Prevalence adenomů hypofýzy v populaci se udává mezi 10–27 % [Dekkers et al. 2008]. Adenomy se dělí na 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 nebo počítačové tomografie [Taboada et al. 2007]. Ve většině případů bývají odhaleny až když dorostou do velikosti makroadenomu (>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].

Nejrychlejším způsobem léčby adenomů hypofýzy 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 hmotnosti 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 biomedicíně, 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.

#### 4.1. 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.

Nádory hypofýzy jsou endokrinologicky klasifikovány na adenomy afunkční a funkční, a ty pak jsou dále klasifikovány dle hypersekrece příslušného hormonu. Prevalence jednotlivých podtypů adenomů ukazuje tabulka 1.

*Tabulka 1. 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, hypogonadismus
Gonadotropní a KAA	26,2 %	FSH, LH	obvykle hormonálně asymptomatické
Tyreotropní	1,1 %	TSH	obvykle hormonálně asymptomatické, vzácně hypertyreóza

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

Prevalence adenomů v České republice a ani ve světě není přesně známá a jednotlivé hodnoty se podle různých studií 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. Na základě dostupných epidemiologických dat je patrné, že v populaci dochází k pozvolnému zvyšování počtu diagnostikovaných adenomů [Daly et al. 2006].

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].

## 4.2. 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].

Chromozomální lokalizace *SSTR1* genu je 14q13, *SSTR2* genu 17q24, *SSTR3* 22q13.1, *SSTR4* 20p11.2 a *SSTR5* 16p13.3 [Barnett 2003]. Všech šest subtypů SSTR patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteinem, které mají typickou strukturu sedmi transmembránových  $\alpha$ -helixových domén. Jednotlivé  $\alpha$ -helixy jsou navzájem spojeny třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami. Nejvyšší vzájemnou homologii má SSTR1 a SSTR4 (63 %), a naopak nejnižší SSTR1 a SSTR3 (37 %) [Sheridan et al. 2000].

Ve většině hypofyzárních nádorů je exprimován převážně SSTR2, druhým nejfrekventovanějším receptorem je SSTR1, následován SSTR3 a 4. Exprese SSTR5 oproti ostatním receptorům se zdá být spíše nádorově specifická a vyskytuje se jen u některých typů [Patel 1997].

## 4.3. Somatostatinová analoga

### 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. Oktreotid vykazuje nejvyšší afinitu k SSTR2 a SSTR5, střední k SSTR3 a velmi nízkou k SSTR1 a SSTR4. 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].



## 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 Phe<sup>7</sup> a Thr<sup>10</sup> má Tyr<sup>7</sup> a Val<sup>10</sup>. 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].

## Pasireotid

Nejnovějším SA je pasireotid (SOM 230). Jedná se o cyklohexapeptid, který je složený z lyzinu, D-tryptofanu, fenylglycinu, aminoethylkarbamoylhydroxyprolinu, fenylalaninu 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 nezávisí na koncentraci. Pasireotid je metabolicky vysoce stabilní a *in vitro* data prokazují, že není substrátem, inhibítozem 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].

#### 4.4. Terapeutický efekt somatostatinových analog

Účinek SA je ovlivněn typem receptoru, na který se SA váže. Udává se, že vazba přes SSTR1, SSTR2 a 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, 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 dopaminovými analogy (DA).

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.

#### 4.5. Modulátory estrogenových receptorů

Selektivní modulátory estrogenových receptorů (ER) představují nehormonální působky, které jsou schopny vazby a aktivace tkáňových ER. 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.

Doposud nebylo publikováno dostatek prací, které by mapovaly expresi ER u KAA. Byl popsán účinek hormonu estrogenu na buňky hypofýzy, který u nich snižoval expresi D2R a naopak zvyšoval expresi ER [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 ER a SSTR. Pomocí *in vitro* studií na krysích buňkách bylo prokázáno, že estrogény zvyšují expresi SSTR2 a SSTR3 u zdravé hypofýzy a prolaktinomů. Stejných výsledků bylo dosaženo i při pokusech na krysách, kde se navíc ukázalo, že estrogény mírně zvyšují expresi SSTR1 a výrazně inhibují SSTR5 [Patel 1999a].

Zdá se, že stimulační účinky estrogenu, resp. modulátorů ER, 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 ER bude patrně nezbytné u každého nádoru vždy stanovit profil SSTR, D2R a ER. Získané znalosti o receptorové výbavě nádorových buněk by mohly přispět k racionálnímu využívání cílenější léčby u této skupiny nádorů.

## **5. Cíle disertační práce**

Pomocí rekombinantních technik vytvořit paletu referenčních vzorků s definovaným množstvím transkriptů příslušných genů pro kalibrační a kontrolní účely.

Provést optimalizaci a validaci metod pro kvantitativní analýzu exprese estrogenového a somatostatínových receptorů a vyšetřit všechny operované adenomy hypofýzy.

Korelovat výsledky vyšetření exprese receptorů s klinickými a imunohistochemickými daty.

U KAA zvolit skupinu vhodnou k medikamentózní léčbě v případě rezidua nebo recidivy po operaci.

Připravit podmínky pro zavedení analýzy kvantitativní exprese receptorů pro rutinní použití.

## 6. Materiál a metodika

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.

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*.

Část resekovaného nádoru byla ihned po vyoperování vložena do zkumavky se stabilizačním roztokem zajišťujícím integritu nukleových kyselin (RNAlater Tissue Protect, Qiagen). 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). Izolace dále pokračovala fenol/chloroformovou extrakcí. Koncentračně optimalizované vzorky RNA byly přepsány do stabilnější formy cDNA (complementary DNA) dle podmínek udaných výrobcem kitu SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen). Molekuly cDNA sloužily jako templát pro vlastní kvantifikaci receptorové exprese. 5 µl z nich se připipetovávalo do 20µl směsi obsahující TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM forward (fw) a reverse (re) primerů a 200 nM hydrolytické fluorescenční sondy. Real time PCR reakce probíhala ve stroji RotorGene 6000 thermal cycler (Corbett Research, Australia). Pro odečet absolutních koncentrací jsme použili plazmidy pCR4 (Invitrogen) se zaklonovanými inzerty SSTR1–5, ER1 a D2R (Generi Biotech, Česká republika). 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.

## 7. Výsledky

Relativní exprese jednotlivých receptorů byla charakterizována v závislosti na klinické diagnóze. Exprese 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.

Dále jsme určili expresní profily pro jednotlivé typy adenomů. Pro akromegalii byla typická vysoká exprese receptorů SSTR2 a D2R. Cushingova choroba tvoří v hypofyzární tkáni velká 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.

Regresní analýza neprokázala ani u jednoho z receptorů věkově vázanou expresi v odebrané tkáni. Výskyt adenomů je nejčastěji diagnostikován v šestém a sedmém deceniu věku. Nebyly zjištěny ani rozdíly mezi ženami a muži. Korelační analýza neprokázala žádný signifikantní vztah mezi expresí receptorů v nádorové tkáni a velikostí KAA. 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).

KAA v hypofýze expandovaly takto: 1 adenom intraselárně, 63 supraselárně, 10 supraselárně a paraselárně, 2 paraselárně, 61 supraselárně a do *sinus cavernosus*, 4 supraselárně, paraselárně i do *sinus cavernosus* a 3 do *sinus cavernosus*. Naše výsledky neprokázaly, že by exprese receptorů asociovala se směrem prorůstání tumorů, nicméně pro přesnou statistiku chybějí v některých podskupinách dostatečné počty vzorků daného typu.

Podle imunohistochemické analýzy byly KAA rozčleněny na *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). Rozdíly v expresích receptorů mezi různými imunohistochemickými typy KAA nebyly příliš vyhraněné, statistická významnost zde byla spíše výjimečná.

V poslední části jsme porovnávali míru vzájemné ko-exprese receptorů u KAA korelační analýzou. Středně silná korelace ( $r=0,686$ ) byla u KAA zjištěna mezi expresí dopaminových a estrogenových receptorů. Další korelace byly střední ( $r=0,3-0,5$ ) nebo slabé ( $n<0,3$ ). Ko-exprese hodnocená ve skupině 44 osob s akromegalií nepřinesla žádný výsledek vyjadřující korelaci vyšší než 0,4. V případě dalších diagnóz korelační analýza nebyla provedena z důvodu malého množství experimentálních vzorků.

## 8. 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 masy [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. 1997].

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 syntézu a sekreci 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.

Podle nejnovějších údajů je u Cushingovy choroby vhodným lékem pasireotid, kterým se po půlroční léčbě podařilo normalizovat hladiny močového kortizolu 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 volného močového kortizolu u 35–40 % pacientů a redukce nádorové masy je pozorována u 20 % osob [Pivonello et al. 2007]. 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 vyšší 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 signifikantně nižší hladinu vykazoval pouze SSTR4. Společným znakem funkčních a klinicky afunkčních ACTH-adenomů bylo široké rozpětí expresí 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 ( $r=0,686$ ). Je patrné, že naše data vykazují nižší stupeň korelace než naznačuje Nishioka et al. [2011].

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 expresí 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.

## 9. Závěry

1) Kalibrační standardy a kontroly byly vytvořeny z plazmidů pCR4 se zaklonovanými inzerty SSTR1–5, ER1 a D2R. Jednotlivé kalibrační body ( $10^1$ – $10^6$  kopií/ $\mu$ l) jsme získali nařazením výchozí koncentrace ( $10^7$  kopií/ $\mu$ l) desítkovou řadou. Na základě vytvořených kalibračních křivek jsme pro všechny typy transkriptů přepočítávali hodnoty CT (cycle threshold) na hodnoty absolutních koncentrací a získali informaci o expresi stanovovaných receptorů v tkáni adenomů. Pro komplexnější přehled receptorového profilu byla u adenomů hypofýzy sledována mimo SSTR a ER1 také exprese D2R.

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.

3) U souboru 144 KAA jsme testovali závislosti expresí receptorů na věku, pohlaví, místu uložení, směru růstu. U žádných z těchto parametrů nebyla nalezena signifikantní korelace.

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

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

## 10. Použitá literatura

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

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

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.

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.

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. 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. 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.

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

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

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.

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

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.

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

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.

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.

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

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.

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

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.

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

MILLER, GM. et al. Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, 80 (04), 1386–1392. ISSN: 0021-972X.

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. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008, 37 (1), 151–171. ISSN: 0889-8529.

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- $\alpha$  mRNAs by non-functioning pituitary adenomas in young patients. *Mol Cell Endocrinol.* 2011, 331 (01), 73-78. ISSN: 0303-7207.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

VAN DER HOEK, J., et al. 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 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 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

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.

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.

## 11. Přehled publikačních činností

### 11.1. Původní vědecké publikace s impact factorem

1. Beránek, M., Drastíková, M., Buchta, V., Kestřánek, J., Špaček, J., Petera, J.: Jednosměrné sekvenování PCR produktů MBL2 genu pomocí polyadenylovaného sekvenačního primeru. *Chemické listy*. 2012, 106, p. 783-787. (IF časopisu 0,5). ISSN: 0009-2770.
2. Beránek, M., Drastíková, Petera, J.: Multiplexní dideoxynukleotidové sekvenování s polyadenylovanými sekvenačními primery. *Chemické listy*. 2013, 107, p. 62-65. (IF časopisu 0,2). ISSN 0009-2770.
3. Beránek, M., Drastíková, M., Sirák, I., Paulíková, S., Petera, J.: Využití jednokapilárového obousměrného sekvenování pro genotypizaci TGFβ1 genu. *Chemické listy*. 2013, 107, p. 880-884, (IF časopisu 0,2). ISSN 0009-2770.
4. Beránek, M., Drastíková, M., Palička V. Nový koncept přípravy referenčních materiálů s heterozygotním genotypem pro molekulárně diagnostické účely. *Chemické listy*. 2014, 108, p. 882-885, (IF časopisu 0,2). ISSN 0009-2770.
5. Paulikova, S., Petera, J., Sirak, I., Vosmik, M., Drastikova, M., Dusek, L., Cvanova, M., Soumarova, R., Spacek, J., Beranek, M.: ATM and TGFB1 genes polymorphisms in prediction of late complications of chemoradiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Neoplasma*. 2014, 61, p. 70-76. (IF časopisu 1,2) ISSN: 0028-2685.
6. Vosmik, M., Laco, J., Sirak, I., Beranek, M., Hovorkova, E., Vosmikova, H., Drastikova, M., Hodek, M., Zoul, Z., Odrázka, K., Petera, J.: Prognostic Significance of Human Papillomavirus (HPV) Status and Expression of Selected Markers (HER2/neu, EGFR, VEGF, CD34, p63, p53 and Ki67/MIB-1) on Outcome After (Chemo-) Radiotherapy in Patients with Squamous Cell Carcinoma of Uterine Cervix. *Pathol Oncol Res*. 2014, 20, p. 131-137. (IF časopisu = 1,8). ISSN 1219-4956.



7. Beranek, M., Drastikova, M., Dulicek, P., Palicka, V. Preparing compound heterozygous reference material using gene synthesis technology: a model of thrombophilic mutations. *Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014, 158, p. 539-543. (IF časopisu 1,7). ISSN 1213-8118.

8. Gabalec, F., Drastikova, M., Netuka, D., Masopust, V., Cesak, T., Machac, J., Marek, J., Cap, J., Beranek, M. Dopamine 2 and somatostatin 1–5 receptors coexpression in clinically non-functioning pituitary adenomas. *Physiol Res.* 2015, přijato k tisku 31.10.2014. (IF časopisu 1,487) eISSN: 1802-9973.

9. Beránek, M., Drastíková, M., Bureš, J., Palička, V. Preparing a triple-compound heterozygous control material for molecular diagnostics of *TPMT* allelic variants. *Folia Biologica*, 2015, přijato k tisku 17.4.2015. (IF časopisu 0,778).

### **11.2. Ostatní publikace v časopisech s impact factorem**

1. Petera, J., Sirák, I., Beránek, M., Vošmik, M., Drastíková, M., Paulíková, S. Molecular predictive factors of outcome of radiotherapy in cervical cancer. A minireview. *Neoplasma.* 2011, 58, p. 469-475. (IF časopisu = 1,2). ISSN: 0028-2685.

### **11.3. Původní vědecké práce v časopisech bez IF**

1. Beránek M., Drastíková M., Paulíková S., Sirák I., Vošmik M., Petera J. D1853N ATM polymorphism in radiosensitive patients with cervical carcinoma. *Acta Medica*, 2011, 54, p. 111-116. ISSN 12-11-4286.

2. Beránek, M., Hegerová, J., Drastíková, M. „Alternativní“ biologický materiál pro rutinní analýzu nukleových kyselin – validace preanalytické fáze vyšetření DNA. *Klin. Biochem. Metab.* 20, 2012, p. 31-37. ISSN 1210-7921.

3. Drastíková, M., Beránek, M., Hegerová, J., Putzová, D., Červinková, B. Význam vyšetření mutací C282Y, H63D a S65C v HFE genu. *Časopis Lékařů českých.* 2012, 151, 428-431. ISSN 0008-7335

4. Beránek, M., Drastíková, M.: Polyadenylation of Sequencing Primers Extends Readability of PCR Amplicons Analyzed by Dideoxynucleotide Sequencing. *Acta Medica*. 2012, 55, p. 160-164. ISSN 1211-4286.

5. Drastíková, M., Gabalec, F., Čáp, J., Beránek, M.: Molecular biology investigation of somatostatin and estrogen receptors in clinically non-functioning pituitary tumors. *Klin. Biochem. Metab.*, 21, 2013, p. 129-132. ISSN 1210-7921.

#### **11.4. Ostatní publikace v časopisech bez IF**

1. Dubská, L., Vyskočilová, M., Nenutil, R., Valík, D., Knoflíčková, D., Fabian, P., Kocáková, I., Beránek, M., Drastíková, M. et al. Vyšetření mutačního statutu genu KRAS jako součást algoritmu léčby metastatického kolorektálního karcinomu. *Čas Lék čes.* 2011, 150, p. 321-326. ISSN 0008-7335.

#### **11.5. Přednášky**

1. Drastíková, M., Beránek M. Molekulárně biologická vyšetření exprese somatostatinových receptorů u adenomu hypofýzy. Přednáška na Regionálním semináři v oboru klinická biochemie, Hradec Králové, 13.12.2011.

2. Drastíková, M. Molekulárně biologická analýza vybraných genetických polymorfismů u nádorů děložního čípku. Přednáška na fakultní konferenci studentů 2. ročníku LFHK, 28.5.2012.

3. Drastíková, M. Molekulárně biologická vyšetření exprese somatostatinových receptorů a estrogenového receptoru u adenomů hypofýzy. Přednáška na XIX. vědecká konference LFHK a FNHK, Hradec Králové, 21.1.2015.

#### **11.6. Postery**

1. Drastíková, M., Beránek, M., Brokešová, S., Petera, J. Význam vyšetření genetického polymorfismu v genech ATM a TGF B1 pro terapii karcinomu děložního čípku. Poster na FONS 2010, Pardubice, 20-21.9. 2010. Abstrakt in: FONS 2010, Program a Sborník, p. 101. Stapro s.r.o. Pardubice ve spolupráci s ČSKB. ISBN 978-80-903879-8-0.

2. Drastíková M, Beránek M, Hegerová J, Putzová D, Červinková B. Výskyt mutací C282Y, H63D a S65C v genu HFE v české populaci a v souboru pacientů se suspektní diagnózou vrozená hemochromatóza. Poster na 10. Celostátním sjezdu ČSKB, Plzeň 25.-27.9.2011. Abstrakt in: Klin Biochem Metab., 2011, 19, p. 198-199. ISSN 1210-7921
3. Drastíková, M., Beránek, M, Gabalec, F., Čáp J. Molekulárně biologické vyšetření somatostatinových receptorů u klinicky afunkčních adenomů hypofýzy. Poster na konferenci FONS 2012, Pardubice, 23.-25.9. 2012. Pořadatel Stapro a ČSKB. Abstrakt in: Fons 2012, Program a Sborník, p. 102. ISBN 978-80-87436-01-1
4. Drastikova, M., Beranek, M., Gabalec, F., Čáp, J.: Molecular biology investigation of somatostatin and estrogen receptors in clinically non-functioning pituitary tumors. Poster na 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Milan, 19.-23.5.2013.
5. Gabalec, F., Drastikova, M., Beranek, M., Netuka, D., Masopust, V., Cesak, T., Marek, J., Cap, J. Somatostatin receptors expression in clinical non-functioning adenomas regarding their immunohistochemical profile. Poster na ENDO 2013, San Francisco, 15.-18.6.2013
6. Drastikova, M., Beranek, M., Gabalec, F., Cap, J.: Molecular biology investigation of somatostatin and estrogen receptors in clinically non-functioning pituitary tumors. Poster na IFCC-Worldlab Istanbul 2014, 22.-26.6. 2014.
7. Drastíková M., Beránek M., Malířová E., Doležal J., Řeháček V.: Porovnání vybraných biochemických parametrů u primární a sekundární hemochromatózy. Poster na XXXV. Imunoanalytické dny Plzeň, 6.-8.4.2014. Abstrakt v: XXXV. Imunoanalytické dny - sborník konference, s.96, Tribun EU,s.r.o 2014 Brno, ISBN 978-80-263-0579-8