

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Hradci Králové



HABILITAČNÍ PRÁCE

Filip Gabalec

Hradec Králové

2018

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Bioindikátory adenomů hypofýzy

Bioindicators of pituitary adenomas

(Habilitationální práce obsahující nové poznatky)

MUDr. Filip Gabalec, Ph.D.

Prohlášení autora

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

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

Hradec Králové, 17. května 2018

MUDr. Filip Gabalec, Ph.D.

„NIHIL EST SIMUL ET INVENTUM ET PERFECTUM“

Cicero, Brutus 18,71 (Nic nebylo zároveň vynalezeno a zároveň dokonalé.)

Poděkování

Děkuji rodině, za podporu a za to, že jsou.

Děkuji svým učitelům, zejména prof. Čápovi, za inspiraci a nasměrování v cestě světem hormonů. Obrovský dík patří i spolupracovníkům, zejména PharmDr. Vojtěchu Tamborovi, Ph.D. a MUDr. Jiřímu Soukupovi. Děkuji MUDr. Jakubu Radochovi, Ph.D. a prof. MUDr. Jiřímu Horáčkovi, CSc. za cenné připomínky.

Děkuji za finanční podporu, bez níž by to nebylo možné. Během několikaletého výzkumu adenomů hypofýzy, byly použity prostředky z těchto grantů a výzkumných projektů:

- Grant 79008 Grantové agentury Univerzity Karlovy.
- Grant Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví IGA NT 11344–4/2010.
- Grant 723912 Grantové agentury Univerzity Karlovy.
- Účelová podpora na řešení projektů zdravotnického výzkumu a vývoje naplňujících vyhlášený Resortní program výzkumu a vývoje Ministerstva zdravotnictví III. na léta 2010 –2015 – interní soutěž FNHK 2013 - MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).
- Podpora projektu v rámci Programu na podporu zdravotnického aplikovaného výzkumu na léta 2015 – 2022 - interní soutěž FNHK 2016 - MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

Obsah

Obsah	6
1 Úvod	11
2 Adenomy hypofýzy	12
2.1 Epidemiologie hypofyzárních tumorů.....	12
2.2 Klinicky afunkční adenomy	13
2.2.1 Definice.....	13
2.2.2 Patogeneze	15
2.2.3 Klinický obraz.....	15
2.2.4 Diagnostika	18
2.2.5 Diferenciální diagnostika.....	20
2.3 Akromegalie	20
2.3.1 Definice.....	20
2.3.2 Etiologie a patogeneze	21
2.3.3 Klinický obraz.....	22
2.3.4 Diagnostika	23
2.3.5 Diferenciální diagnostika.....	23
3 Léčba a sledování klinicky afunkčních adenomů.....	24
3.1 Observace	24
3.2 Chirurgická léčba	25
3.2.1 Úspěšnost chirurgické léčby	26
3.2.2 Komplikace	26
3.3 Farmakologická léčba	27
3.3.1 Agonisté dopaminu (DA).....	27
3.3.2 Somatostatinová analoga	28
3.3.3 Temozolamid	28
3.3.4 Terapie radionuklidy značenými peptidy (PRRT).....	29
3.3.5 Příloha 1. Gabalec et al. Klinicky afunkční adenomy – možnosti farmakologické léčby	30
3.3.6 Příloha 2. Gabalec et al. Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically nonfunctioning pituitary adenomas.....	36

3.3.7	Příloha 3. Gabalec et al Chlopenní vady při léčbě hyperprolaktinémie dopaminovými agonisty	43
3.3.8	Příloha 4. Gabalec et al. Dopamine 2 and Somatostatin 1-5 Receptors Coexpression in Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas	48
3.4	Radioterapie	57
3.5	Faktory pro předpověď rekurence klinicky afunkčních adenomů	58
3.5.1	Klinické faktory	58
3.5.2	Histologické faktory	58
3.5.3	Proteomická analýza	59
4	Léčba akromegalie.....	60
4.1	Operace	60
4.2	Farmakologická léčba	60
4.2.1	Agonisté dopaminu	60
4.2.2	Somatostatinová analoga a jejich receptory.....	60
4.2.3	Predikce odpovědi na farmakologickou léčbu.....	61
4.2.4	Nežádoucí účinky	63
4.2.5	Příloha 5. Drastíková M. et al. Expression profiles of somatostatin, dopamine, and estrogen receptors in pituitary adenomas determined by means of synthetic multilocus calibrators	64
4.3	Radioterapie a Pegvisomant.....	71
5	Cíle	72
5.1	Proteomická analýza klinicky afunkčních adenomů.....	72
5.2	Korelace dysregulovaných proteinů a receptorů zjištěných proteomickou analýzou s imunohistochemickým vyšetřením u adenomů hypofýzy	72
5.3	Korelace exprese somatostatinových receptorů a dopaminového receptoru 2 typu mezi imunohistochemií a real-time PCR	72
6	Metodika.....	73
6.1	Proteomická analýza	73
6.2	Imunohistochemické/histopatologické vyšetření	74
6.3	Real-time PCR	75
6.3.1	Příloha 6. Beránek M. et al. Syntetický multilokusový kalibrátor pro studium genové exprese v nádorech hypofýzy vyvolávajících akromegalii.	76
6.4	Statistická analýza.....	81
7	Výsledky.....	82

7.1	Proteomická analýza	82
7.1.1	Zavedení postupu pro zpracování vzorků tkáně	82
7.1.2	„průzkumná“ LC-MS analýza	87
7.1.3	Pilotní komparativní analýza vzorků od pacientů s progresí a bez progresu růstu adenomu.	87
7.2	Korelace dysregulovaných proteinů a receptorů s imunohistochemickým vyšetřením u adenomů hypofýzy	94
7.3	Korelace exprese somatostatinových receptorů a dopaminového receptoru 2 typu mezi imunohistochemií a real-time PCR	96
8	Diskuze	98
9	Závěr	104
10	Literatura	105

Použité zkratky

ACTH – adrenokortikotropní hormon

AIP – Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CNS – centrální nervový systém

D2R – D2 podtyp dopaminového receptoru

DA – dopaminergní agonisté

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DR – dopaminový receptor

FDG - fluorodeoxyglukosa

FIPA – familiární izolovaný pituitární adenom

MEN-1 – mnohočetná endokrinní neoplázie

FSH – folikulostimulační hormon

GATA2 - GATA binding protein 2

GH – „growth hormone“ – růstový hormon

GHRH – „growth hormone releasing hormone“ – somatoliberin

GPCR – „G-protein coupled receptor“ – receptor spřažený s G-proteinem

IGF-I – inzulínu podobný růstový faktor I

KAA – klinicky afunkční adenom

LH – luteinizační hormon

MAPK – mitogen-aktivovaná proteinkináza

MR – magnetická rezonance (iMR – intraoperační magnetická rezonance)

mRNA – messenger – ribonukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PET-CT – Pozitronová emisní tomografie

Pit1 - Pituitary-specific positive transcription factor 1

PRL – prolaktin

PRRT - peptide receptor radionuclide therapy

PTTG – Pituitary tumor transforming gene

QoL – „quality of life“ – kvalita života

qrtRT-PCR – kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

RT-PCR – reverzně transkriptázová / zpětná polymerázová řetězová reakce

SF1 - Steroidogenic factor 1

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

SSA – somatostatinová analoga

SSTR – somatostatinový receptor

T-Pit - pituitary-restricted transcription factor

TRH – tyreotropin "releasing" (uvolňující) hormon

TSH – tyreotropin

VIP – vasoactive intestinal peptide – vasoaktivní střevní peptid

1 Úvod

Habilitační práce představuje souhrn našeho dosavadního výzkumu v oblasti hypofyzárních adenomů. Je koncipována jako práce přinášející nové poznatky a současně komentuje některé naše doposud publikované práce. Jde o příspěvek shrnující naši snahu objevit prognostický marker u nemocných s klinicky afunkčními adenomy a prognostický marker odpovědi na farmakologickou léčbu akromegalie.

Nemocní s klinicky afunkčními adenomy představují velké procento mezi hypofyzárními tumory. Etiologie a patogeneze tohoto onemocnění není stále zcela objasněna. Primární léčebnou metodou je jednoznačně transsfenoidální neurochirurgický výkon, ten má však své limitace a nevede ve většině případů k úplnému odstranění tumoru. Jak se ale bude chovat reziduální tkáň? Lze predikovat, u koho dojde k růstu adenomu a u koho ne? Jak zajistit nemocného po operaci - Leksellův gama nůž nebo sporná farmakologická léčba? Ptáme se tedy na to, zda je možné při využití nových proteomických metod stanovit marker progresu a pomoci, tak rozlišit agresivně rostoucí a indolentně se chovající adenomy?

Akromegalie podobně jako klinicky afunkční adenomy je primárně řešena neurochirurgem. Bohužel u velkého počtu nemocných je rovněž nutná farmakologická léčba před operací nebo v případě reziduální aktivity i po operaci. Dá se nějak předvídat její efekt? Kterou z farmakologických možností ovlivnění nadprodukce růstového hormonu vybrat? Může nám stanovení dopaminových a somatostatinových receptorů v této indikaci pomoci?

V teoretické části je podán přehled současných poznatků o klinicky afunkčních a somatotropních adenomech, možných cestách patogeneze těchto tumorů, klasifikaci, epidemiologii, klinických symptomech, diagnostice a léčbě. U klinicky afunkčních adenomů jsou rozebrány možnosti proteomické analýzy a potencionální biomarkery. U akromegalie je uveden také souhrn poznatků o dopaminových a somatostatinových receptorech, jejich stavbě, signálních drahách, možnostech zobrazení a využití v predikci léčebné odpovědi.

Experimentální část práce analyzuje pilotní projekty malé skupiny nemocných ve snaze najít odpovídající prediktivní markery a přináší nové poznatky k současnému poznání.

2 Adenomy hypofýzy

2.1 Epidemiologie hypofyzárních tumorů

Hypofyzární adenomy patří mezi nejčastější expanze hypofýzy s vysokou prevalencí v běžné populaci.¹ Dle metaanalýzy z roku 2004 je celková prevalence asi 16,7 %. Z toho 14,4 % v pitevních souborech a 22,5 % v radiologických studiích.² Prevalence klinicky manifestních adenomů je nižší. V dobře definovaných populacích byla prevalence 75.7-94/100 000 obyvatel klinicky manifestních případů³⁻⁵ a incidence 3,9-4,1/100 000 obyvatel a rok.⁵⁻⁷ Ve statistické zprávě Centrálního registru mozkových tumorů ve Spojených státech amerických (Central Brain Tumor Registry of the United States) za léta 2010-2014 je patrný mírný nárůst oproti předchozím rokům a hypofyzární tumory tvoří 16,2 % všech histologicky ověřených tumorů. Jsou tak na 2. místě v pořadí četnosti mezi všemi primárními tumory centrálního nervového systému (CNS).⁸ Častější je výskyt hypofyzárních adenomů u žen než u mužů (7:1), u klinicky afunkčních a somatotropních adenomů je však predominance u mužského pohlaví. Výskyt dle pohlaví se lišil také v závislosti na věku, kdy predominance mužského pohlaví byla zřejmá po 50. roce života, u mladších osob bylo o něco více žen.⁹ Afroameričané jsou postiženi častěji než kavkazský typ populace. Nejvyšší incidence hypofyzárních adenomů je pak mezi 30 a 60 lety. Vzácně se objevují hypofyzární adenomy u osob mladších 20 let.⁹ Ve více než 99 % jde o mikroadenomy, jejichž zvýšený záchyt byl zaznamenán v posledních letech díky zavedení nových zobrazovacích metod – zejména magnetické rezonance. Vzhledem k jejich velikosti nepůsobí nositeli žádné obtíže a ten se nemusí o mikroadenomu ani dozvědět.¹⁰ Pokud se adenomy projeví klinickým syndromem z hormonální nadprodukce některého z hormonů nebo i jejich kombinací, mohou být zachyceny dříve. Příznaky z hypersekrece chybí přibližně u třetiny adenomů – klinicky afunkčních adenomů (KAA). Většina z nich jsou v době diagnózy makroadenomy (96,5 %).¹¹ Mezi nimi největší podíl – 65 % - zaujímají gonadotropinomy. Vyskytnout se mohou v kterémkoli věku, nejčastěji mezi 50. a 60. rokem života. Akromegalie je onemocnění způsobené nadměrnou produkcí růstového hormonu. Prevalence se pohybuje v rozmezí 28-137/1 milión obyvatel.¹²⁻¹⁶ Při cíleném univerzálním screeningu může však být prevalence 5 - 15 krát vyšší.¹⁷⁻²⁰ Incidence je 2-11/1 milión obyvatel a rok.¹² U dospělých se akromegalie může objevit ve všech věkových skupinách. Nejvyšší výskyt je mezi 40 a 50 lety. Dojde-li ke vzniku onemocnění v mládí před uzávěrem růstových štěrbin, nazýváme onemocnění gigantismus. Data o jeho výskytu chybí, protože je raritní.

2.2 Klinicky afunkční adenomy

2.2.1 Definice

Adenomy hypofýzy jsou benigní nádory z buněk hypofýzy. Adenomy mohou produkovat hormony v nadbytku a projeví se pak klinickým syndromem z jejich nadprodukce - Cushingova choroba u ACTH produkujícího adenomu, hyperprolaktinémie u prolaktinomu nebo akromegalie u adenomu produkujícího růstový hormon. Adenomy, které se neprojevují příznaky z nadprodukce hormonů, nazýváme klinicky afunkčními adenomy (KAA). Jde o různorodou skupinu. Část z této skupiny neprodukuje žádný hormon - tzv. null cell adenomy a onkocytomy. Většina z KAA hypofyzární hormony syntetizuje a skladuje. Hormonální tvorbu lze prokázat u adenomů bez hypersekrečních příznaků imunohistochemicky a elektronopticky až v 90 % případů. Nejčastěji je produkován luteinizační hormon (LH), folikulostimulační hormon (FSH) nebo jejich α podjednotka. V tomto případě jde o gonadotropinomy. Null-cell adenomy dohromady s gonadotropinomy tvoří asi 85 % operovaných KAA.²¹ Zbývajících 15 % KAA patří mezi tiché „silent“ adenomy, které sice hormon tvoří, ale nesecernují ho, nebo je hormon rozložen uvnitř buňky. Jiné adenomy hormony tvoří jen v nepatrném množství, proto se klinicky neprojeví. Nejčastěji do této skupiny patří tichý kortikotropní adenom, méně často zachytíme produkci ostatních hormonů, někdy i více současně u tzv. plurihormonálních adenomů. Některé adenomy produkují hormony „neklasické“ (neurotenzin, cholecystokinin, galanin, VIP, PP polypeptid, angiotensin, atd.). Podíl KAA mezi nádory hypofýzy se na základě různé studované populace (v operačních souborech jsou jen afunkční makroadenomy, v klinických souborech jsou zahrnuty všechny adenomy) pohybuje mezi 10 % až 35 %. Dle klasifikace hypofyzárních adenomů dle WHO 2017 jsou nově uznány role transkripčních faktorů v diferenciaci tumoru dle buněčné linie, regulaci hormonální produkce a možné tumorigenezi. S ohledem na tento nový přístup, byl koncept „hormon produkujícího adenomu“ opuštěn a adenomy se nyní dělí dle svého původu z buněčné linie. Dále jsou pak rozděleny dle specifických imunohistochemických a histologických znaků. Následkem toho je imunohistochemie nyní nezbytná pro diagnostiku.²² Viz. Tabulka 1

Podle velikosti dělíme adenomy hypofýzy na mikroadenomy (< 10 mm) a makroadenomy (\geq 10 mm).

2017 WHO patologická klasifikace hypofyzárních adenomů			
Typ adenomu	Morfologické varianty	Imunohistochemický profil	Transkripční a jiné faktory
Somatotropní adenom			
	Hustě granulovaný /Densely granulated	GH, α -podjednotka	Pit-1
	Řídce granulovaný / Sparsely granulated	GH	Pit-1
	Mammosomatotropní	GH + PRL (v jedné stejné buňce) \pm α -podjednotka	Pit-1, ER α
	Smíšený somato-laktotropní	GH + PRL (v různých buňkách) \pm α -podjednotka	Pit-1, ER α
Laktotropní adenom			
	Řídce granulovaný / Sparsely granulated	PRL	Pit-1, ER α
	Hustě granulovaný /Densely granulated	PRL	Pit-1, ER α
	Acidofilní adenom z kmenových buněk	PRL, GH (fokálně a variabilně)	Pit-1, ER α
Tyreotropní adenom		β -TSH, α -podjednotka	Pit-1, GATA2
Kortikotropní adenom			
	Hustě granulovaný /Densely granulated	ACTH	Tpit
	Řídce granulovaný / Sparsely granulated	ACTH	Tpit
	adenom z Crookeho buněk	ACTH	Tpit
Gonadotropní adenom		β -FSH, β -LH, α -podjednotka (různé kombinace)	SF-1, GATA2, ER α
Null cell adenom		nic	nic
Plurihormonální adenom			
	Pit-1-pozitivní Plurihormonální adenom	GH, PRL, β -TSH \pm α -podjednotka	Pit-1
	Adenomy s neobvyklou imunohistochemickou kombinací	Různé kombinace	

Tabulka 1 WHO histopatologická klasifikace hypofyzárních adenomů při využití imunohistochemického vyšetření vč. transkripčních faktorů. Převzato dle Mete et al. 2017

2.2.2 Patogeneze

Faktory, které způsobují vznik klinicky afunkčních adenomů nejsou zcela objasněné. Adenomy jsou většinou monoklonálního původu.²³ Zda za úvodní mutací stojí aktivace protoonkogenu či inaktivace tumor supresorového genu není jasné. U hypofyzárních nádorů se žádný známý onkogen nevyskytuje častěji.^{24, 25} U pacientů s dědičnými hypofyzárními adenomy v rámci syndromů jako jsou např. mnohočetná endokrinní neoplázie typu I (MEN I), Carneyho komplex a familiární izolovaný hypofyzární adenom (FIPA) byly zjištěny specifické mutace (MEN 1, PKAR1A nebo respektive AIP). U sporadických adenomů se nevyskytují. Spíše u akromegalie než u KAA se může vyskytovat mutace gsp. Spočívá v mutaci dvou kritických nukleotidových sekvencích charakteristických pro doménu α podjednotky G_s-proteinu (kodon 201, kde je arginin zaměněn za cystein, nebo kodon 227, kde je glutamin zaměněn za arginin). Tato změna blokuje hydrolýzu GTP. G_s-protein membránového receptoru je tak stále aktivován. U akromegalie se vyskytuje ve 30–40 %, ale u KAA pouze u malého počtu 7 %.²⁶⁻²⁹ Přímý důkaz, že trvalá aktivace cAMP díky gsp mutaci hraje primární roli při vzniku tumoru, nebo že ovlivňuje růst či rekurenci, chybí.³⁰ Z genů, které by mohly hrát roli v patogenezi hypofyzárních adenomů, byly identifikovány 3. První je „pituitary tumor transforming gene“ (PTTG), který je exprimován v nadbytku ve všech typech adenomů oproti normální hypofýze.³¹ Dalším genem se zdá být trunkovaná isoforma receptoru-4 pro fibroblastový růstový faktor, práce však byla nedávno stažena pro manipulaci s fotografiemi, přesto, že autoři tvrdí, že závěry jsou správné.^{32, 33} Třetím by mohl být MEG3 tumor supresní gen, který selektivně chybí u KAA.³⁴ Samotná mutace ke spuštění progresu adenomu nestačí, a tak jsou zkoumány i ostatní faktory.

Vliv hypotalamických releasing hormonů jako primární příčina je sporný. Mohou však hrát roli v dalším průběhu – stimulovat růst adenomu a sekreci hormonů. U jedinců s dlouhotrvajícím hypogonadismem bylo pozorováno zvětšení hypofýzy při trvalé stimulaci gonadotropních buněk gonadoliberiny. Ne však tvorba adenomu.³⁵ Zkoumány jsou alterace nitrobuněčné komunikace, které mohou působit jako kofaktory tumorigeneze.²⁵ Patogeneze KAA je stále neobjasněna, předpokládáme, že jde o komplexní souhru několika systémů.

2.2.3 Klinický obraz

Klinicky afunkční adenomy patří mezi nádory, které zůstávají dlouho nerozpoznány. Je to z důvodu nedostatečné, variabilní sekrece nebo vylučované hormony nezpůsobují klinicky relevantní syndrom, přesto, že mezi ně patří gonadotropinomy. Gonadotropinomy tvoří naprostou většinu klinicky afunkčních adenomů. KAA na sebe upozorní často, až když

dosáhnou velikosti, která způsobuje neurologické obtíže. Symptomatologie odpovídá lokalizaci adenomu. Mikroadenomy se nemusí vůbec projevit a v dnešní době častého používání zobrazovacích metod jsou spíše náhodně zachyceny při vyšetření z jiných důvodů jako incidentalomy.

2.2.3.1 Neurologické symptomy

Porucha zorného pole je způsobena suprasellární extenzí adenomu, který způsobuje kompresi optického chiasmatu. Nejčastěji je výpadek zorného pole v temporální části – tzv. bitemporální hemianopsie. Může být postiženo jedno nebo obě oči s různou intenzitou. Snížení zrakové ostrosti se projeví až při významné kompresi. Vznik obtíží je s ohledem na pomalý růst plíživý a nemocní tak nevyhledají oftalmologa po mnoho měsíců až let. Oční příznaky se vyskytují u 60-70 % nemocných.¹¹ Někdy nemusí být deficit v zorném poli rozpoznán až do té doby, než je provedeno vyšetření perimetru. Kompresí okulomotorických nervů při šíření adenomu laterálně může vzniknout **diplopie**. Mezi další neurologické příznaky patří **bolesti hlavy**. V případě makroadenomu jsou asi u 25 % nemocných. Bolesti hlavy jsou pravděpodobně způsobené rozšířením sedla a napínáním diafragmatu.³⁶ Jejich upřesnění je nespecifické. Častější bývají po ránu. **Rhinorrhea** mozkomíšního moku není častá a bude způsobena šířením adenomu kaudálně při infiltraci sphenoidálního sinu a destrukci kosti. Velmi nepříjemným příznakem jsou intenzivní bolesti hlavy a zrakové poruchy při **apoplexi** – náhlém krvácení do adenomu.³⁷ Extrémně vzácným případem jsou objemné expanze schopné infiltrovat mozkovou tkáň. Infiltrace mozkové tkáně se projeví širokou škálou neurologickým symptomů - epiparoxysmy, změny chování či kognitivní deficit. Nádory hypofýzy raritně metastazují do mening a intracerebrálně.

2.2.3.2 Apoplexie

Apoplexie je klinický obraz vzniklý při náhlé změně objemu tumoru. Vzniká při infarktu a/nebo krvácení. Termín se používá pro případy, kdy jsou přítomny symptomy. Je poměrně vzácná, s prevalencí 6,2 na 100000 obyvatel a incidencí 0,17 na 100000 obyvatel a rok.^{4, 6} Až u 25 % nemocných dojde k asymptomatickému krvácení. I když se může objevit u všech hypofyzárních adenomů, nejčastěji vzniká právě u KAA. Patofyziologie není zcela objasněna. Za precipitující faktory se považují snížení krevního průtoku v hypofýze (velké operace, kardiochirurgické a ortopedické výkony, angiografie, trauma), zvýšení krevního průtoku (hypertenze, zvýšená fyzická aktivita), stimulace hypofýzy (dynamické testy) a poruchy koagulace (antikoagulancia, trombocytopenie).³⁸ Klinický obraz je velmi variabilní.

Nejčastěji pak jde o náhle vzniklé bolesti hlavy a zrakové poruchy. Dráždění mening a intrakraniální hypertenze mohou způsobit nauzeu a zvracení. Zavádějící může být fotofobie a horečka. Až ve 22 % je přítomna alterace vědomí. V případě podezření na apoplexii je nutné k diagnostice zobrazení hypofýzy (MR nebo rychleji dostupné CT) a vyloučení hypopituitarismu. Viz.2.2.3.3. Léčba je individuální – observace nebo chirurgický zákrok. Indikace k operaci je zejména u nemocných, kdy nedochází ke zlepšení stavu ani po úpravě vnitřního prostředí a korekci hormonálního deficitu (kortikoidy). Největší šance na zlepšení zrakových poruch je tehdy, když je výkon proveden do 7 dnů od vzniku apoplexie. Zlepšení hormonálního deficitu je vzácné.

2.2.3.3 *Hormonální deficit - hypopituitarismus*

Tumor rostoucí v omezeném prostoru tureckého sedla tlačí na zdravou tkáň. Jejím útlakem způsobí částečný deficit hypofyzární funkce nebo v případě výpadku všech hormonů panhypopituitarismus. Může také komprimovat stopku a omezit vliv hypotalamických hormonů. Komprese stopky brání inhibičnímu vlivu dopaminu a je důvodem hyperprolaktinémie až u třetiny nemocných. Tyto problémy se vyskytují až u 50 % nemocných. Vyšetření hormonální funkce hypofýzy je obligátní součástí vyšetření. Hormony vypadávají ve většině případů v pořadí LH a FSH (až 77 %) – GH – TSH – ACTH.³⁷ Výpadek LH vede u mužů k nižším hladinám testosteronu. S nimi souvisí snížení energie a libida. K lékaři je ale dovede málokdy. U premenopauzálních žen je nejčastějším důsledkem snížení gonadotropinů amenorea. Centrální/sekundární hypotyreóza se projevuje stejnými příznaky jako hypotyreóza primární. Objevují se kožní příznaky (suchá kůže, prosáklé podkoží či jazyk, suché vlasy), únavnost, slabost, změna hlasu, zácpa, adynamie, zimomřivost, bradykardie, v závažnějších případech perikardiální výpotek a nespecifické změny na EKG. Nedostatek růstového hormonu nemusí být klinicky příliš nápadný. K příznakům patří zvýšení podkožního tuku centrálně, snížení svalové hmoty, nespecifické pocity únavy a slabosti. Při sekundární adrenální insuficienci způsobené nedostatkem adrenokortikotropního hormonu – ACTH je zvýšená slabost, únavnost, apatie, psychická alterace, nechutenství, nauzea a bolesti břicha. Mineralokortikoidy nejsou ovlivněny, deficit glukokortikoidů může způsobit hyponatrémii a hypoglykémii. Na hyponatrémii se podílí i sekundární hypotyreóza, která je také příčinou zvýšené koncentrace cholesterolu, vyšší aktivity kreatinkinázy a transamináz v laboratorním nálezu. Dlouhotrvající deficit nadledvinových i ovariálních androgenů se projeví ztrátou axilárního a posléze pubického ochlupení u žen.

2.2.3.4 Nadprodukce gonadotropinů

Nadprodukce gonadotropinů, hlavně FSH, je nejméně obvyklým klinickým projevem.³⁹ Samotné zařazení do kategorie klinicky afunkčních adenomů je sporné, ale dnes již tyto tumory patří mezi gonadotropinomy. U premenopausálních žen v průměrném věku 32 let byla zjištěna ovariální hyperstimulace - amenorea nebo oligomenorhea, bolesti břicha, zvětšená, někdy cystická, ovária.⁴⁰ Koncentrace estradiolu v séru > 500 pg / ml by měla vyvolat podezření, že četné ovariální cysty představují spíše gonadotropinom než syndrom polycystických ovárií (PCOS). Zvětšená testes jsou důsledkem hypersekrece FSH u mužů.⁴¹ V důsledku zvýšené velmi vzácné sekrece intaktního luteinizačního hormonu (LH) stoupají hladiny testosteronu u mužů. U chlapců před pubertou vede tato abnormalita k předčasné pubertě, u dospělých mužů se projeví zvýšenými hladinami testosteronu, akné a mastnou kůží. Problém v interpretaci může nastat u žen v menopauze a primárním hypogonadismu u mužů, kdy jsou hladiny LH a FSH vysoké.

2.2.4 Diagnostika

Diagnóza začíná klinickým vyšetřením a zjištěním, zda by příznaky z hormonální nadprodukce (v případě sekretujících adenomů)/snížené produkce a/nebo zrakové a/nebo neurologické příznaky popsané výše mohly souviset s adenomem hypofýzy. Adenom může být také zjištěn náhodně při zobrazovacím vyšetření hlavy z jiné indikace.

2.2.4.1 Zobrazovací vyšetření hypofýzy

Magnetická rezonance (MR) je dostatečně citlivé vyšetření k detekci adenomů. Zejména v případě KAA, které se projeví často symptomy z útlaku a bývají dostatečně velké. MR je vyšetření nezátěžující pacienta radiací, je schopno svou citlivostí zobrazit průběh optického chiasma a vztah k adenomu. Citlivější je i pro malé léze, pro velmi malé adenomy je užitečná dynamická MR hypofýzy.⁴² MR má přednost vždy, pokud není kontraindikována. MR může při podání kontrastní látky rovněž prokázat aneurysma, což je významné před neurochirurgickou intervencí. Výhoda CT je ve zobrazení kalcifikací a kosti, což je důležité např. u kraniofaryngeomu. MR ani CT nedokáže odlišit jednotlivé typy adenomu, i když v T2 váženém obraze se mohou jednotlivé typy lišit. Hyperintenzitu lze pozorovat u 80 % mikroprolaktinomů, iso- nebo hypointenzní jsou dvě třetiny mikroadenomů s nadprodukcí GH.⁴³

2.2.4.2 Vyloučení hormonální nadprodukce

Diagnóza KAA je stanovena vyloučením hormonální nadprodukce. Mimo klinické vyšetření provedeme laboratorní vyšetření hormonů. Akromegalii vylučujeme odběrem IGF-I a výsledek interpretujeme s ohledem na věk a pohlaví. Orální glukózový toleranční test, kdy očekáváme supresi GH, nám pomůže v případě neurčitěho nebo pozitivního výsledku IGF-I k potvrzení diagnózy. Cushingovu chorobu je možno vyloučit pomocí dexamethasonového supresního testu. Krátkou variantou je 1 mg noční dexametazonový supresní test. V případě hraničního výsledku použijeme dexametazonový supresní test 2 denní s 0,5 mg dexametazonu po 6 hodinách. Současně je vhodné provést i 24 hodinový sběr moči na volný močový kortizol. Příčinou diferenciatně diagnostických rozpaků bývá mírná hyperprolaktinémie při útlaku stopky hypofýzy. Pro prolaktinom bývají charakteristické hodnoty nad 150 $\mu\text{g/l}$ (4500 mIU/l), pro makroprolaktinom jsou charakteristické hodnoty nad 250 $\mu\text{g/l}$ (7500 mIU/l).⁴⁴ Vyloučení prolaktinomu je esenciální pro odlišnou strategii léčby. Dále stanovujeme gonadotropiny a jejich volné podjednotky. U 40 % pacientů je pozitivní odpověď β -LH, β -FSH a α -podjednotky na podání TRH v dynamickém testu. Pacient s primárním hypogonadismem tuto odpověď nemá a test tak můžeme v tomto případě použít k odlišení adenomu.⁴⁵ Specificita zvýšení podjednotek gonadotropinů u tohoto testu není jednoznačná, může dojít ke zvýšení i ostatních typů pituitárních tumorů.⁴⁶ Vzácně může dojít při TRH testu k apoplexii. Mechanismus není zcela jasný.⁴⁷ Rovněž vyšetřujeme tyroidální osu za pomoci stanovení hladin tyreotropinu (TSH) a volných tyroidálních hormonů – tyroxinu (fT4) a trijódtyroninu (fT3).

2.2.4.3 Vyloučení hypopituitarismu

Mimo klinické příznaky výše uvedené k posouzení gonadotropní osy vyšetříme bazální koncentrace LH, FSH a testosteron u mužů nebo estradiolu u žen. Při hypopituitarismu budou periferní sexageny nízké a hladiny LH, FSH nízké nebo neadekvátně v normálním rozmezí. Nedostatek růstového hormonu nemusí být klinicky příliš nápadný. K příznakům patří zvýšení podkožního tuku centrálně, snížení svalové hmoty, nespecifické pocity únavy a slabosti. K vyloučení deficitu sekrece GH používáme insulin toleranční test. Při inzulinem navozené hypoglykémii se současně zhodnotí osa kortikotropní. Alternativou při kontraindikaci je test argininový, glukagonový a test se somatoliberinem (growth-hormone realising hormone - GHRH). Tyroidální osu vyšetříme za pomoci TSH, fT4, fT3. Volné hormony budou nízké a k nim bude nízké nebo neadekvátně normální TSH. K posouzení osy hypotalamus-hypofýzy-nadledviny stanovujeme sérový kortizol a ACTH.

K orientačnímu zhodnocení adrenální rezervy lze využít Synacthenový test s analogem ACTH. Zlatým standardem je výše zmíněný insulin-toleranční test. Léčba při podezření na hypopituitarismus se zahajuje i bez laboratorního potvrzení diagnózy a dynamické testy se odkládají na dobu, kdy je nemocný stabilizován. Léčba spočívá v substituci příslušného hormonu, infuzní terapii a podání glukózy. Substituci tyroxinem zahajujeme až za 12 hodin po podání hydrokortisonu. Základním principem je substituovat jen ty deficity, které skutečně existují. Po operaci je nutno nemocné zajistit substitucí kortikoidy, vždy však musí následovat endokrinologické vyšetření, které často prokáže, že kortikotropní osa není poškozena.^{48, 49}

2.2.4.4 Oftalmologické vyšetření

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

2.2.5 Diferenciální diagnostika

Pituitární adenomy tvoří okolo 71–92 % z parasellárních a sellárních lézí v závislosti na tom, zda šlo o radiologickou studii či studii s operovanými pacienty. V recentní neuroradiologické studii hypofyzární adenomy tvořily právě 71 % z hypofyzárních incidentalomů.⁵⁰ Zbytek sellárních lézí tvoří benigní cystické léze, germinální tumory, gliomy, lymfomy, meningiomy, metastázy karcinomů (nejčastěji karcinom prsu, plic, prostaty, méně pak např. karcinom pankreatu, nebo ledviny), vaskulární léze, granulomatózní a zánětlivé léze, infekce a pituitární hyperplázie. Nejčastější z afekcí mimo adenomy je Rathkeho cysta (19–23 %) a kraniofaryngiom (15 %). Metastázy tvoří asi 5–25 % případů.^{51, 52}

2.3 Akromegalie

2.3.1 Definice

Akromegalie je vzácné onemocnění charakterizované nadměrnou sekrecí růstového hormonu (growth hormone – GH) a následně insulinu-podobnému faktoru-I (IGF-I). Zdroj GH je primárně v benigním (somatotropním) adenomu hypofýzy. Chronická expozice nadbytku GH a IGF-I vede ke klinickým symptomům jako je růst skeletu periostální apozicí – tj. nadočnicové oblouky, růst čelisti). Nejde o růst do délky. Dále se zvětšují všechny

orgány kromě mozku - štítná žláza, larynx, kloubní chrupavky, atd. Dochází k metabolickým a kardiovaskulárním změnám a je snižena kvalita života. Společně tyto změny vedou k významně zvýšené morbiditě a mortalitě zejména na podkladě kardiovaskulárních a respiračních onemocnění.⁵³⁻⁵⁵ Normalizace hladin GH a IGF-I vede k úpravě mortality na úroveň obecné populace.⁵⁶

2.3.2 Etiologie a patogeneze

Akromegalie je nejčastěji (95 %) způsobena adenomem hypofýzy, vzácně pak extrahypofyzárním onemocněním. Bližší histologická klasifikace viz.kapitola 2.2.1. Přesná patogeneze je stejně jako u KAA nejasná. Za normálních okolností je GH produkován v somatotropních buňkách adenohipofýzy. Pomocí zpětných vazeb je jeho sekrece kontrolována. Stimulace přichází z hypotalamu - somatoliberin (growth hormone releasing hormone, GHRH) a ghrelin. Somatostatin naopak sekreci inhibuje. V případě akromegalie je sekrece GH autonomní. Nadměrná stimulace somatoliberinem nejčastěji z hamartomu, gangliocytomu nebo neuroendokrinního tumoru vede k hyperplazii somatotropních buněk a výjimečně k adenomu.⁵⁷ Naprostá většina adenomů je sporadická. Z nich se u 40 % vyskytuje bodová mutace gsp genu pro alpha-podjednotu stimulačního G-proteinu buněčné membrány, která vede k trvalému zvýšení cAMP. 10 % sporadických adenomů produkuje další hormon/y společně s GH. Nejčastěji prolaktin, méně často tyreotropin anebo alfa-podjednotku. Vzácně zachytíme GH produkující karcinom hypofýzy (v literatuře 6 případů, pouze jeden s metastázami mimo CNS) nebo jiné maligní tumory s ektopickou produkcí GH nebo GHRH. Nejčastěji jde o karcinoid, karcinom pankreatu nebo plic. Familiární akromegalie viz.

Tabulka 2

Tabulka 2 Familiární akromegalie⁵⁸⁻⁶⁰

Syndrom	gen	výskyt	poznámky
Mnohočetná endokrinní neoplázie 1	Menin chromosom 11q13	10 % nemocných s MEN1	mladší nemocní
Carneyho komplex	PRKAR1A chromosom 17q22-24 nebo 2p16	70 % nemocných	
McCune-Albright	GNAS1 chromosom 20q13	20 % nemocných	

„X-linked acrogigantism“	GPR101 chromosom Xq26.3		
Familiární izolovaný pituitární adenom FIPA	AIP		Mladší nemocní, vyšší hladiny GH, často rezistentní k léčbě

2.3.3 Klinický obraz

Chronické zvýšení GH a IGF-I vede k růstu akrálních částí těla, změnám v obličeji, muskuloskeletálním obtížím. Dojde-li k zvýšené sekreci GH před uzavěrem růstových chrupavek, vede pak onemocnění ke gigantismu. Nemocní s akromegalií také trpí kardiovaskulárními a metabolickými abnormalitami. Mezi ně patří hypertenze, arytmie, kardiomegalie, diabetes mellitus a dyslipidemie. Klinické příznaky při plně se projevujícím onemocnění jsou obvykle jasně viditelné, nicméně mnoho pacientů je stále diagnostikováno opožděně (5-10 let). S ohledem na to, že spousta příznaků je nespecifických a společných s ostatními onemocněními (např. únava, bolesti kloubů) je lékařům, stomatologům a chirurgům doporučeno zvažovat diagnózu vždy, pokud se pacient ukáže s některým ze symptomů nebo komorbidit uvedenými níže. V pokročilejších případech je obvykle přítomen makroadenom s infiltrací okolních struktur nebo bez nich, což komplikuje úplné odstranění nádoru. Příznaky z expanze adenomu jsou zmíněny v kapitole 2.2.3.1.

Klinické známky akromegalie

- Zvýšené pocení
- Bolesti hlavy
- Syndrom karpálních tunelů
- Zubní malokluze, prognie, prognatismus, makroglosie, rozestup zubů
- Mnohočetné kožní skvrny, kožní fibromy
- Spánková apnoe
- Rekurentní polypy střeva
- Oligomenorea/amenorea
- Diabetes mellitus 2. typu při absenci rodinné zátěže nebo typického fenotypu
- Artróza velkých kloubů

2.3.4 Diagnostika

Klinický obraz nás na správnou diagnózu navede, je však nutno ve všech případech onemocnění laboratorně potvrdit. Stanovení GH má své úskalí v pulzní sekreci. GH je uvolňován během dne v 6-10 pulzech s různým časovým odstupem. Měření náhodné hodnoty GH nemá tedy moc velký význam. V krevním oběhu jsou také dvě formy GH (20 a 22 kDa). Na našem pracovišti stanovujeme GH obvykle třikrát za sebou v jednohodinovém odstupu.

Dále se k potvrzení diagnózy používá orální glukózový supresní test. GH u zdravého jedince po požití 75 g glukózy by v tomto testu neměla přesáhnout hodnotu 1 µg/l (2 mIU/l). Zvažován byl i nadir GH 0,4 µg/l. U akromegalie bývá vyšší. S ohledem na různé typy esejí, neexistuje konsensus o nejnižší hodnotě GH.

Účinek GH je zprostředkován přes IGF-I. IGF-1 je produkován ve spoustě buněk a tkání, jeho hladiny v krvi jsou určeny zejména produkcí v játrech. Jeho sekrece je kontrolována GH. Hladiny IGF-1 jsou během dne stabilní, protože je vázán na bílkovinné nosiče. Při interpretaci IGF-1 je nutné hodnotit dle norem pro příslušný věk a pohlaví. Eseje ke stanovení IGF-1 jsou však méně robustní a hladiny IGF-1 mohou být ovlivněny přítomností dalších onemocnění. Hladina IGF-1 může být nižší při špatně kontrolovaném diabetu, jaterním onemocnění, exogenním přívodu estrogenů anebo malnutrici. Naopak vyšší hodnoty jsou přítomny v pubertě, těhotenství a při hypertyreóze. U akromegalie jsou hladiny mnohonásobně zvýšené.

Máme-li laboratorně potvrzenou diagnózu akromegalie, přistupujeme k dalším vyšetřením. Nezbytné je MR hypofýzy a oční vyšetření perimetr. Doplnujeme zhodnocení funkce hypofýzy a vylučujeme hypopituitarismus. Viz. kapitola 2.2.3.3 Současně vyšetřujeme glykémii nalačno a glykovaný hemoglobin k vyloučení metabolických komplikací při vysokých hladinách GH. Při dalších klinicky patrných symptomech doplňujeme hladiny kalcia (MEN1), EKG případně i UZ srdce, předozadní snímek plic, vyšetření ve spánkové laboratoři při syndromu spánkové apnoe.

2.3.5 Diferenciální diagnostika

Někteří zdraví jedinci mohou mít akromegaloidní rysy. U nich pomůže laboratorní vyšetření. Problém nastává u mladších jedinců s familiárně urychleným růstem. Hladiny IGF-1 jsou v pubertě vysoké a při oGTT nemusí dojít k supresi GH. V těchto případech nezbývá než sledování, opakovaní testů a MR.

3 Léčba a sledování klinicky afunkčních adenomů

3.1 Observace

Údaje o přirozeném průběhu neléčených klinicky afunkčních adenomů jsou známy z observačních studií. V recentním souhrnu 14 studií⁶¹⁻⁷⁴ (Tabulka 3) jsou data celkem o 648 nemocných s klinicky afunkčními adenomy, kteří nepodstoupili léčbu.⁷⁵ Důležité je zmínit, že ne vše byly „pravé“ incidentalomy a nemocní měli symptomy z útlaku nebo hypopituitarismus. Makroadenomy tvořily 65 %, zbytek byly mikroadenomy. U 18 % nemocných došlo ke zvětšení tumoru, u 10,5 % ke zmenšení a 71,1 % nedošlo během několikaletého sledování ke změně velikosti. Samozřejmě záleží i na počáteční velikosti tumoru – zda šlo o mikro- nebo makroadenom. Mezi 229 mikroadenomy se zvětšil nádor u 10 % nemocných, zmenšil u 7 % a stejná velikost byla patrna u 83 % nemocných při sledování 1-8 let pomocí MR. U makroadenomů pak došlo k růstu ve 23 %, zmenšení ve 12 % a stejná velikost byla popsána u 65 % nemocných.⁷⁵ V přehledech publikovaných dříve se udává incidence růstu náhodně zachyceného mikroadenomu 3,3/100 pacientů a rok a u makroadenomů 12,5/100 pacientů a rok.⁷⁶ Při dlouhé době sledování je riziko růstu makroadenomů až 50 %. Šance, že makroadenom poroste na rozdíl od mikroadenomu, narůstala s časem.⁷⁰ V současné době nejsou randomizované studie pro sledování KAA. Postoj ke zcela afunkčním incidentalomům hypofýzy je v současné době konzervativní – vyčkávací. Je předpoklad, že většina těchto náhodně zachycených lézí nebudou karcinomy. Výše zmíněná data podporuje i fakt, že mezi celkovým počtem 12 411 hypofýz z pitevních studií byl průměrný záchyt adenomu 11,3 % a mimo 3 byly vše mikroadenomy. Relativní absence makroadenomů tedy nasvědčuje, že pravděpodobnost růstu a přeměny mikroadenomu na makroadenom jsou raritní.⁷⁰ Nízké riziko růstu incidentalomů nás nutí tyto nemocné dispenzarizovat. Zhodnocení endokrinních funkcí je vhodné po půl roce, neboť endokrinní funkce zbylé tkáně může být ohrožena rostoucím tumorem.⁷⁷ Častost kontrol je však stále předmětem diskuzí. Magnetickou rezonanci je vhodné udělat do jednoho roku od diagnózy.³⁷ Na pracovišti III. interní kliniky 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze provádějí kontroly u nálezů menších než 10 mm ne dříve než za 1 rok, a nedochází-li k růstu, poté za 2 roky a následně za 5 let.¹⁰ Doporučené postupy americké Endocrine Society doporučují MR každý rok po dobu 3 let a poté méně často pro mikroadenomy.⁷⁸ Pro asymptomatické makroadenomy je doporučeno provést MR již za 6 měsíců a dále 1x ročně po dobu 3 let.⁷⁸ V nedávné studii pak růst více

jak 10 mm³/měsíc při vyhodnocení MR ve 2 letech sledování je velmi prediktivní pro více jak 20 % zvětšení objemu nebo indikací k chirurgickému výkonu.⁷³ Nesmíme zapomínat na pravidelnou kontrolu perimetru. U asymptomatických makroadenomů je však strategie "watch-and-wait" stále diskutabilní. Pro KAA projevující se příznaky z útlaku je primární volbou transsfenoidální resekce adenomu.

Tabulka 3 Změny incidentalomů v jednotlivých studiích. Převzato z Huang et al.⁷⁵

	Mikroadenomy			Makroadenomy			Roky sledování		
	Celkem	Zvětšení	Zmenšení	Bez změn	Celkem	Zvětšení		Zmenšení	Bez změn
Reincke et al.	7	1	1	5	7	2	0	5	8,0
Donovan and Corenblum	15	0	0	15	16	4	0	12	6–7
Nishizawa et al.					28	2	0	26	5,6
Feldkamp et al.	31	1	1	29	19	5	1	13	2,7
Igarashi et al.	1	0	0	1	22	6	10	6	5,1
Sanno et al.	74	10	7	57	165	20	22	123	2,3
Day et al.	11	1	0	10	7	1	0	6	3,2
Arita et al.	5	2	0	3	37	19	0	18	5,2
Karavitaki et al.	16	2	1	13	24	12	4	8	3,6
Dekkers et al.					28	14	8	6	7,1
Anagnostis et al.	6	0	1	5	3	1	0	2	4,0
Lenders et al.	27	1	3	22	23	9	2	12	3,0
Esteves et al.	14	0	2	12	12	1	3	8	3,2
Iglesias et al.	22	4	1	17	28	0	1	27	1,2
Celkem (n = 648)	229	23 (10%)	17 (7%)	189 (83%)	419	96 (23%)	51 (12%)	272 (65%)	

3.2 Chirurgická léčba

Operační zákrok je metodou volby pro KAA. Makroadenomy a expanzivní nádory projevující se příznaky z útlaku okolních struktur vyžadují neurochirurgickou intervenci.⁴⁵

První transsfenoidální resekci hypofyzárního tumoru provedl v roce 1907 Herman Schloffer.

Na Chirurgické klinice Univerzitní nemocnice v Innsbrucku operoval 30letého muže z Prahy se šestiletou anamnézou těžkých bolestí hlavy, hypogonadismem a pouze zbytky zraku.⁷⁹

V další dekádě Harvey Cushing popularizoval tuto techniku a do dnešní doby je technika stále zdokonalována.⁸⁰ V současné době je preferován transsfenoidální přístup a využití endoskopických technik v kombinaci s neuronavigací. Transkraniální přístup je rezervován pro objemné masy umístěné supraselárně.^{37,81} Cílů operačního zákroku je několik. Je nutné

eliminovat tlak nádorové masy na hypofýzu a okolní struktury, uchovat či zlepšit poškozenou hormonální sekreci z hypofýzy, zachovat či zlepšit zrakové a neurologické funkce a odstranit tumor celý nebo, pokud možno, jeho co největší část k zabránění recidivy. V posledních letech se rozvíjí techniky s využitím MR během operace k posouzení rozsahu neurochirurgického výkonu. Je možné využít nízko magnetické intraoperační MR systémy s vyšší mobilitou nebo MR s vysokým magnetickým polem, nižší mobilitou, ale lepší zobrazovací kvalitou. Od roku 2008 se intraoperační MR (iMR) používá i na pracovišti v Ústřední vojenské nemocnici v Praze Střešovicích.⁸²

3.2.1 Úspěšnost chirurgické léčby

Již předoperačně je nutné stanovit si předpokládaný rozsah výkonu. S ohledem na časté šíření mimo intrasellární oblast je nutné rozhodnout, zda půjde o zákrok radikální nebo jen parciální resekci. V případě předpokládané radikální resekce byla na pražském pracovišti úspěšnost 69 % a po zavedení iMR se díky zjištěnému neočekávanému reziduu podařilo zákrok radikalizovat v dalších 22 %.⁸² Na Neurochirurgické klinice FN Hradec Králové bylo za léta 2000–2007 reziduum přítomno u 46 % nemocných operovaných pro KAA.⁸³ Perioperační mortalita je minimální – do 1 %^{82, 84}. Po operaci můžeme pozorovat zlepšení (v 60–85 %), nebo dokonce normalizaci (v 30–50 %) zrakového pole^{37, 85}. Zlepšení deficitní hormonální sekrece, která je způsobená útlakem zdravé hypofyzární tkáně, je méně časté. Dvě velké studie udávají zlepšení v 32,8 a 64,9 % případů v gonadální ose, v 41,6 a 71,9 % případů v ose adrenální a v 35,7 a 33,9 % v ose tyreoidální.^{84, 86} Dle radikality výkonu může naopak dojít i k prohloubení hormonální insuficience.^{87, 88} Po operaci je nutné nemocného sledovat a vyšetřit jeho hormonální funkce. V případě deficitu je na místě substituční léčba. Nutné je vyšetření perimetru. První zobrazovací vyšetření děláme v odstupu nejméně 3 měsíců pro postoperační změny v oblasti selly.⁸⁹

3.2.2 Komplikace

Komplikace neurochirurgické léčby jsou minimální, v méně než 5 %.⁸⁴ Jsou přímo závislé na zkušenostech neurochirurga. Poměrně často se vyskytují transientní minerálové poruchy – asi u 75 % případů. Častější než hyponatrémie (21 %) je diabetes insipidus (38.5 %). Diabetes insipidus se objevuje nejvíce již první pooperační den a zmizí ve většině případů do 10 dní. Hyponatrémie se objevuje ke konci prvního týdne po operaci a přetrvává asi 5 dní. Většinou jde o poruchy mírné. Léčbu desmopressinem dlouhodobě vyžaduje jen velmi malé procento pacientů.⁹⁰ Dalšími komplikacemi může být zhoršení zrakových funkcí (0,5–

2,4 %), krvácení (0,8–2,8 %), likvorea (1,5–4,2 %), meningitida (0,2–1,9 %), poranění karotidy (0,4–1,4 %) nebo oftalmoplegie (0,4–1,9 %).^{21, 84} Rizikovými faktory pro pooperační komplikace jsou vyšší věk a intraventrikulární propagace tumoru.⁹¹

3.3 Farmakologická léčba

Farmakologický přístup k léčbě KAA patří stále mezi kontroverzní. V minulých letech jsme publikovali na toto téma práci ⁹² **Viz. Příloha 1.** Recentně bylo publikováno několik přehledových prací skupinou kolem Yony Greenman.^{93,94} KAA nemůže být vždy resekován. Pro nekompletně odstraněné adenomy a nemocné nevhodné k operaci připadá v úvahu ozáření, ale přibývá i dat o možném využití farmakologické léčby.

3.3.1 Agonisté dopaminu (DA)

Za normálních okolností sekrece dopaminu z hypotalamu cestou dopaminových D2 receptorů (D2R) na laktotropech vede k redukci sekrece prolaktinu. Většina adenomů, bez ohledu na jejich zařazení, exprimuje dopaminové receptory. Exprese je ale značně heterogenní. Detailní data o expresi dopaminového receptoru u KAA byla publikována včetně vlastního velkého souboru našich nemocných.⁹⁵ **Viz. Příloha 2.** U prolaktinomu jsou agonisté dopaminu lékem volby. Je otázkou, zda podobný efekt DA lze předpokládat i u KAA. V dřívějších malých studiích a kazuistikách byl nejvíce používán bromokriptin a quinagolid, v posledních letech je lékem volby účinnější kabergolin. V roce 2015 byla publikována zatím největší studie s využitím DA v léčbě KAA pro reziduální tumor po operaci.⁹⁶ Nemocným (n = 79) sledovaným po dobu $8,8 \pm 6,5$ roku byla titrována dávka kabergolinu dle tolerance až do dávky 2 mg/týden.

U 55 nemocných byla léčba zahájena při nálezů residua na prvním pooperačním MR, u dalších 24 při záhytu růstu residua. Tumor zůstal pod kontrolou v 87,3 % v první skupině oproti 46,7 % ve druhé skupině. U 58 % nemocných došlo ke zmenšení nebo zastavení růstu residua. Rozdíl byl i v potřebě následné terapie (ozáření) – 13 % ve skupině s preventivním podáním a 42 % v kontrolní skupině. Korelace odpovědi na léčbu s expresí dopaminových receptorů imunohistochemicky nebo mRNA zůstává sporná.⁹⁷ K podobným závěrům jako Greenman došli i další autoři.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Ke stabilizaci došlo až u 80 % nemocných a zdá se, že preventivní podání DA je lepší než vyčkávací strategie. Cílem není sice zmenšení tumoru jako v případě prolaktinomu, ale vyhnout se ozáření nebo další operaci. Při dávkách kabergolinu, které jsou používány v léčbě prolaktinomu nebo KAA, je riziko chlopenních vad minimální. Detailně viz naše přehledová práce.¹⁰¹ **Viz. Příloha 3.**

3.3.2 Somatostatinová analoga

Anti-proliferativní a anti-sekreční účinek somatostatinu a současně i jeho analog je ovlivněn především podtypem receptoru, přes který je uskutečňován. Geny pro jednotlivé typy receptorů jsou lokalizovány na různých chromosomech, což naznačuje nejen individuální transkripční kontrolu každého z nich, ale i jejich rozdílnou funkčnost. Recentní práce ukazují, že agonizace každého z těchto receptorů je skutečně spojena s aktivací rozličných signálních drah a rozdílnou buněčnou odpovědí. Společně všechny podtypy receptorů sdílejí aktivaci druhých posílů po navázání somatostatinu. Jde o inhibici sekrece adenylátcyklázy, inhibici kalciových kanálů, stimulaci fosfotyrosinové fosfatázy a MAPK. Všechny podtypy váží nativní somatostatin s vysokou afinitou. Afinita k oktapeptidovým somatostatinovým analogům je však rozdílná. SSTR1 a SSTR4 mají afinitu nízkou, naopak dobře je váží, ale s rozdílnou afinitou SSTR2,3 a 5. SSTR2 a SSTR5 jsou zapojeny především do regulace uvolňování somatotropinu a TSH. SSTR5 i prolaktinu. Exprese somatostatinových receptorů u klinicky afunkčních adenomů je rovněž heterogenní a nedosahuje míry exprese D2R. Naše vlastní pozorování.¹⁰² **Příloha 4.**

Účinky léčby SSA u KAA shrnula Colao.¹⁰³ Oproti *in-vivo* pracím v reálné praxi u KAA dochází ke zmenšení tumorózní masy u KAA při použití SSA pouze ve 12 %. Doba sledování byla krátká pro posouzení prevence dalšího růstu. V roce 2015 publikoval studii případů a kontrol 26 nemocných Fusco.¹⁰⁴ Všichni měli pozitivní nález na scintigrafii a dostávali oktreetid LAR 20 mg/4 týdny. Nádor se zvětšil v 19 %, u ostatních zůstal po dobu 37 měsíčního sledování stabilní. U 53 % (7/13) nemocných bez pozitivní scintigrafie došlo k růstu nádoru. Zajímavý je příznivý rychlý účinek SSA na bolesti hlavy a zrakové obtíže, který přesně nebyl dosud vysvětlen. Vzhledem k převaze exprese SSTR3 je možné, že další analog pasireotid s vazbou na SSTR1-3 a SSTR5 by mohl mít větší efekt. Mechanismus účinku pasireotidu u KAA na růst tumoru se předpokládá v inhibici cévního endotelového růstového faktoru právě cestou aktivace somatostatinových receptorů.¹⁰⁵ Dosud nebyla publikována klinická studie s pasireotidem u KAA. S ohledem na častý diabetes, který provází léčbu pasireotidem, je indikace pasireotidu jako léčebného opatření k prevenci růstu KAA sporná.

3.3.3 Temozolamid

Temozolamid je využíván v léčbě agresivních tumorů hypofýzy. S ohledem na vzácný výskyt velmi agresivních hypofyzárních tumorů (karcinomů) máme k dispozici spíše

kazuistická sdělení. Oproti sekrečním adenomům bylo dosaženo u KAA odpovědi jen ve 22 %, stable-disease ve 48 %.¹⁰⁶

3.3.4 Terapie radionuklidy značenými peptidy (PRRT)

Použití PRRT je zatím spíše experimentální, mělo by být použito při vyčerpání ostatních možností, neboť data pocházejí zejména z kazuistických sdělení. Použit byl s alespoň částečným pozitivním účinkem ¹⁷⁷Lu-DOTATOC, a ¹⁷⁷Lu-DOTATATE^{107, 108}.

- 3.3.5 Příloha 1. Gabalec et al. Klinicky afunkční adenomy – možnosti farmakologické léčby**
- 3.3.6 Příloha 2. Gabalec et al. Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically nonfunctioning pituitary adenomas**
- 3.3.7 Příloha 3. Gabalec et al Chlopenní vady při léčbě hyperprolaktinémie dopaminovými agonisty**
- 3.3.8 Příloha 4. Gabalec et al. Dopamine 2 and Somatostatin 1-5 Receptors Coexpression in Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas**

KLINICKY AFUNKČNÍ ADENOMY HYPOFÝZY – MOŽNOSTI FARMAKOLOGICKÉ LÉČBY

CLINICALLY NON-FUNCTIONING PITUITARY ADENOMAS – POSSIBILITIES OF MEDICAL TREATMENT

FILIP GABALEC, JAN ČÁP

*Katedra interních oborů, subkatedra endokrinologie, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové
a II. interní klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové*

SOUHRN

Klinicky afunkční adenomy představují asi jednu třetinu hypofyzárních tumorů. V současné době je léčbou první volby rostoucích afunkčních adenomů transfenoidální resekce, která však často nemůže být kompletní. S ohledem na přítomnost dopaminových a somatostatinových receptorů v hypofýze jsou vyvíjena a zkoušena nová analoga ligandů těchto receptorů. Uveden je přehled dosavadních zkušeností s použitím těchto analogů v léčbě klinicky afunkčních adenomů.

Klíčová slova: adenom hypofýzy, klinicky afunkční adenom, dopaminová analoga, dopaminový receptor, somatostatinová analoga

SUMMARY

Clinically non-functioning adenomas represent about one third of pituitary tumors. Nowadays transsphenoidal neurosurgery is the treatment of choice for growing non-functioning adenomas. However, complete tumor removal is quite often not possible. New analogs binding dopamine and somatostatin receptors are being developed to treat functioning pituitary tumors. Current experiences with use of these analogs in the treatment of clinically non-functioning adenomas are reviewed.

Key words: pituitary adenoma, clinically non-functioning adenoma, dopamine agonist, somatostatin analog, dopamine receptor

Úvod

Prevalence hypofyzárních adenomů není přesně známa, dostupná data se liší. Nově je udávána prevalence klinicky diagnostikovaných adenomů v průřezové studii lokalizované do několika regionů v Belgii 1 případ na 1064 obyvatel (Daly et al., 2006). Při systematickém průzkumu se pohybovala frekvence záchytu adenomů hypofýzy v pitevnických souborech od 3,5 % (Muhur et al., 1981) až po 35 % (Burrow et al., 1981). Dle metaanalýzy těchto dat je frekvence výskytu adenomů hypofýzy - 14,4 % (Ezzat et al., 2004). Velké rozdíly jsou i v systematickém průzkumu radiologických studií, kdy frekvence záchytu incidentalomů (tedy náhodně zachycených expanzí hypofýzy, které ne vždy dokáže radiolog rozlišit) byla od 10 % (Hall et al., 1994) do 38,5 % (Chong et al., 1994). I zde provedl Ezzat metaanalýzu s frekvencí záchytu expanzí hypofýzy v radiologických studiích 22,5 % (Ezzat et al., 2004). Ve více než 99 % jde o mikroadenomy, jejichž zvýšený záchyt byl zaznamenán v posledních letech díky zavedení nových zobrazovacích metod – zejména magnetické rezonance. Vzhledem k jejich velikosti nepůsobí nositeli žádné obtíže a nemusí se o nich ani dozvědět (Marek, 2001). Pokud se adenomy projeví klinickým syndromem z hormonální nadprodukce některého z hormonů nebo i jejich kombinací, mohou být zachyceny dříve. Přibližně u třetiny adenomů příznaky z hypersekrece chybí. Tyto adenomy nazýváme kli-

nicky afunkčními adenomy (KAA). Většina z nich jsou v době diagnózy makroadenomy (96,5 %) (Ferrante et al., 2006).

ZAVÁDĚJÍCÍ DEFINICE

Hormonální tvorbu lze prokázat i u adenomů bez hypersekrečních příznaků imunohistochemicky a elektronopticky až v 90 % případů. Některé hormony však nejsou secernovány a jsou rozloženy uvnitř buňky (silentní adenomy), jiné se tvoří jen v nepatrném množství, které se klinicky neprojevuje. U gonadotropních adenomů bývá sekrece pouze podjednotek těchto hormonů (alfa-podjednotka, beta – FSH, beta-LH i beta-TSH). Méně často zachytíme produkci imunoreaktivního PRL, ACTH či GH). Některé adenomy produkují hormony „neklasičké“ (neurotensin, cholecystokinin, galanin, VIP, PP polypeptid, angiotensin...). Všechny tyto adenomy, bez příznaků z hormonální hypersekrece, nazýváme afunkčními. Na základě různé definice může být podíl KAA mezi nádory hypofýzy 10 %, pro nádory zcela bez sekrece („null-cell“ adenomy), nebo až 35 %, pro adenomy bez příznaků hypersekrece (Katznelson et al., 1993).

ETIOLOGIE

Patogeneze KAA nebyla dosud zcela objasněna. Analýzou alelické inaktivace X chromozomu byl zjištěn monoklonální

původ (Alexander et al., 1990). Žádná mutace ze známých onkogenů se nevyskytuje u hypofyzárních nádorů častěji. Samotná mutace však zřejmě pro růst nádoru nestačí (Acunzo et al., 2009).

LÉČBA

Postoj ke zcela afunkčním mikroadenomům hypofýzy a malým incidentalomům, tedy náhodně zachyceným lézím při zobrazovacím vyšetření z jiných důvodů, je v současné době konzervativní – vyčkávací. Je předpoklad, že většina těchto náhodně zachycených lézí zůstane stacionární. Riziko růstu mikroadenomu v čase je malé. Do velikosti makroadenomu se zvětší až 15 % mikroadenomů (Molitch, 1993). Ve stejném procentu se však mohou i zmenšit. Riziko růstu nás nutí tyto nemocné dispenzarizovat. Další zhodnocení endokrinních funkcí je vhodné každého půl až jeden rok, neboť endokrinní funkce zbylé tkáně může být ohrožena rostoucím tumorem. Častost kontrol je však stále předmětem diskuzí. Magnetickou rezonanci je vhodné udělat do roka (Dekkers et al., 2008). Na pražském pracovišti provádějí kontroly u nálezů menších než 10 mm ne dříve než za 1 rok a nedochází-li k růstu, tak za 2 roky a následně za 5 let (Marek, 2001).

Makroadenomy projevující se příznaky z útlaku okolních struktur vyžadují neurochirurgickou intervenci (Jaffe, 2006). U makroadenomů je i častější růst – až v 50 % pro KAA (Dekkers et al., 2007). Při odstranění je dominantní transfenoidální přístup a využití endoskopických technik v kombinaci s neuronavigací. Transkraniální přístup je rezervován pro objemné masy umístěné supraselárně.

Po operaci můžeme pozorovat zlepšení (v 60–85 %) nebo dokonce normalizaci (v 30–50 % případů) zrakového pole (Caron, 2009; Dekkers et al., 2008). Zlepšení deficitní hormonální sekrece utlačené zdravé hypofyzární tkáně je naopak vzácné. K úplnému odstranění vede samotná operace makroadenomu málokdy a často zůstává residuum. K recidivě růstu nádoru dochází v 11 až 46 % (Park et al., 2004). Signifikantně horší výsledky jsou u nemocných s větším residuem, s invazí především do kavernózního sinu a u nemocných s invazí supraselárně (Greenman et al., 2003) však nebyl přesvědčivý marker pro zhodnocení rizika recidivy dosud objeven. Proto je po operaci nebytná dispenzarizace a při jasném růstu nádoru zvážení terapie. V současnosti se v indikovaných případech používá Leksellův gama nůž. Další možností je stereotaktické frakcionované ozáření. Pokroky v medikamentózní terapii hyperfunkčních adenomů vedly a vedou ke snaze využít ji i u KAA.

MEDIKAMENTÓZNÍ TERAPIE

V posledních letech s využitím dopaminových (DA) a somatostatinových analogů (SSA), s příchodem nových preparátů se znovu otevřela diskuze o medikamentózní léčbě KAA, především jako prevence recidivy onemocnění. Využití DA, objevených v 70. letech, k léčbě bylo založeno na faktu, že v hypotalamo-hypofyzárním systému dopamin blokuje cestou dopaminových receptorů sekreci prolaktinu (PRL) (Lamberts a Macleod, 1990).

Dopaminové receptory (DR) patří do rodiny receptorů sprážených s G proteinem. DR dělíme na dvě hlavní skupiny: D1 receptoru podobné (D1-like) a D2 receptoru podobné (D2-like). Do první skupiny patří D1 a D5 subtyp DR. Do D2-like skupiny patří D2, D3 a D4 subtypy. Obě skupiny se liší svými vlastnostmi farmakologickými, biochemickými,

funkčními i anatomickým rozmístěním (Missale et al., 1998). Z farmakologického hlediska jsou rozdíly především v afinitě k jednotlivým agonistům a antagonistům, např. dopamin má 20krát větší afinitu k D3 receptoru než k D2. Samotný D2 má dvě isoformy, které se liší v řetězci 29 aminokyselin ve třetí intracelulární kličce dopaminového receptoru. Podle délky tohoto řetězce rozeznáváme krátkou (D2S) a dlouhou (D2L) isoformu. Zdá se, že kratší isoforma vykazuje větší aktivitu, než isoforma dlouhá (Missale et al., 1998). Zda je to modifikační postreceptorové signalizace, není dosud zcela jasné.

V hypofýze byla přítomnost D2 receptorů zjištěna poprvé pomocí radioligandů v 70. letech 20. století. D2 receptory se nacházejí v předním laloku hypofýzy, v laktotropních buňkách, kde zprostředkovávají inhibiční účinek dopaminu z hypotalamu na sekreci prolaktinu. V předním laloku je přítomen i D4 subtyp, a to až v 17 % (Pivonello et al., 2004). Jeho funkce není však zcela dobře prozkoumána. Aktivací D2 v hypofýze se spouští následující regulační mechanismy – inhibice adenylcyklázy, je ovlivněn metabolismus fosfatidylinositolu, aktivovány draslíkové kanály a naopak inhibovány kanály kalciové (Ferone et al., 2007). Inhibice sekrece PRL, snížení jeho hladin v periferní krvi a ve většině případů zmenšení až vymizení prolaktinomu pomocí aktivace D2 receptorů pomocí DA se stala u prolaktinomů terapeutickou možností volby. (Gillam et al., 2006). Mimo fyziologickou přítomnost D2 receptorů na povrchu buněk zdravé hypofýzy můžeme nalézt expresi D2 receptoru u prolaktinomu i KAA (Koga et al., 1987). Několik studií prokázalo přítomnost míst vázících dopamin v KAA pomocí radioligandů (Bevan a Burke, 1986). Při použití *in-situ* hybridizace byla přítomnost D2 receptorů u KAA až v 89 %. Rozložení D2L a D2S je velmi heterogenní. Oproti normální hypofýze byla přítomnost D2 receptorů u KAA stejná nebo o něco nižší, ale lišila se různým poměrem zastoupení dlouhé a krátké isoformy D2 receptoru (Renner et al., 1998). Za použití RT-PCR udává Pivonello u KAA o něco nižší expresi D2 (67 %), ale rovněž s predominancí D2L (Pivonello et al., 2004).

Na základě těchto dat byl zkoumán efekt léčby DA *in vitro* a *in vivo*. Přehled výsledků jednotlivých studií lze vidět v tabulce č. 1. Ke zmenšení KAA došlo při léčbě DA kumulativně ve 30 %. Samotné výsledky jsou však rozporuplné. Ke zlepšení poškození zrakového pole došlo ve 20 %. Výsledky zlepšení mohou být ještě vyšší, neboť v pracích je kalkulováno i s pacienty bez zrakových obtíží (Colao et al., 2008a). K růstu tumoru došlo při léčbě DA pouze v 8 %, výsledek je ale limitován krátkou dobou sledování. Využití medikamentózní léčby se předpokládá po operaci. Vzhledem k tomu se doporučuje, aby v operačních vzorcích byla stanovena exprese D2 a v pooperačním průběhu tomuto nálezu byla věnována pozornost (Colao et al., 2008a). Důležitým a dosud neznámým zdrojem by byl nástroj k predikci odpovědi tumoru na léčbu DA. V práci Pivonella bylo zjištěno, že exprese D2 signifikantně koreluje s odpovědí na podání kabergolinu (Pivonello et al., 2004). K dnešnímu dni je to ojedinělá práce hodnotící expresi D2 semikvantitativně. Hodnocena byla i korelace zobrazovacích metod. Zobrazení D2 je možné pomocí „single-photon emission computed tomography“ (SPECT) za použití 123I-S(-)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidiny)methyl]-2-hydroxy-3-iodo-6-methoxybenzamide (123I-IBZM) nebo při použití obdobné molekuly 123I-epidepridu (de Herder et al., 1996). Lepších výsledků bylo dosaženo s 123I-epidepridem. Možnost využití 123I-epidepridu ani 123I-IBZM jako prediktivního faktoru léčby DA pro klinické použití se však nepotvrdila (de Herder et al.,

Tab. 1 Přehled výsledků studií s dopaminovými agonisty u klinicky afunkčních adenomů

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

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

BRC = bromokriptine, Q = quinagolide. CAB = kabergolin, LAR = dlouhodobě působící bromokriptin

1999; Ferone et al., 1998). Další možností je zobrazení pomocí PET s antagonisty D2 označenými uhlíkem C11 jako 11C-N-raclopride a 11C-N-methylspiperone. Studie byly provedeny zejména u prolaktinomů a GH-secernujících adenomů, prokázán byl vyšší záchyt farmaka u adenomů reagujících na terapii oproti rezistentním. U KAA byl celkově pozorován nižší záchyt než u prolaktinomů (Bergstrom et al., 1991). Vzhledem k tomu, že není do dnešního dne znám prediktor invazivity či růstu nádoru po operaci, zůstává preventivní léčba dopaminovými agonisty předmětem debat. Někteří autoři se kloní k rutinnímu použití (Greenman, 2007). To však stejně jako v případě radioterapie nelze obecně doporučit.

U podávání dopaminových agonistů nelze opomenout v poslední době verifikované negativní účinky dlouhodobého podávání větších dávek. Signifikantní zvýšení rizika poškození trikuspidální chlopně s následnou trikuspidální regurgitací při podávání více než 3 mg pergolidu či kabergolinu na rozsáhlé skupině nemocných s Parkinsonovou chorobou z vědeckého registru ve Velké Británii potvrdil Schade (Schade et al., 2007), k obdobným závěrům došel i Zanettini (Zanettini et al., 2007). Na základě těchto dat byly provedeny studie nemocných s prolaktinomy (Bogazzi et al., 2008; Colao et al., 2008b; Kars et al., 2008a; Lancellotti et al., 2008; Vallette et al., 2008; Wakil et al., 2008), kdy 3× zvýšená prevalence středně závažné trikuspidální regurgitace byla prokázána pouze v jedné studii (Colao et al., 2008b), ve dvou byla regurgitace méně závažná. Ostatní srdeční chlopně vyšším rizikem zatíženy nebyly. Negativní účinky se projevují při vyšších dávkách a nevyskytují se u od ergotaminu neodvozených preparátů. Což je v souladu s hypotézou, že za změnami chlopně stojí vazba cabergolinu na serotoninový (5-hydroxytryptamine 2B) receptor, který způsobuje mitogenezu a zmnožení fibroblastů (Kars et al., 2008b). Ostatní negativní účinky DA jsou dobře známé a shrnuty v práci Gillamové. V

golinu na rozsáhlé skupině nemocných s Parkinsonovou chorobou z vědeckého registru ve Velké Británii potvrdil Schade (Schade et al., 2007), k obdobným závěrům došel i Zanettini (Zanettini et al., 2007). Na základě těchto dat byly provedeny studie nemocných s prolaktinomy (Bogazzi et al., 2008; Colao et al., 2008b; Kars et al., 2008a; Lancellotti et al., 2008; Vallette et al., 2008; Wakil et al., 2008), kdy 3× zvýšená prevalence středně závažné trikuspidální regurgitace byla prokázána pouze v jedné studii (Colao et al., 2008b), ve dvou byla regurgitace méně závažná. Ostatní srdeční chlopně vyšším rizikem zatíženy nebyly. Negativní účinky se projevují při vyšších dávkách a nevyskytují se u od ergotaminu neodvozených preparátů. Což je v souladu s hypotézou, že za změnami chlopně stojí vazba cabergolinu na serotoninový (5-hydroxytryptamine 2B) receptor, který způsobuje mitogenezu a zmnožení fibroblastů (Kars et al., 2008b). Ostatní negativní účinky DA jsou dobře známé a shrnuty v práci Gillamové. V

zásadě je lze rozdělit do 3 skupin: 1) gastrointestinální obtíže – nejčastěji nauzea, zvracení, zácpa, 2) kardiovaskulární – posturální hypotenze a 3) neurologické – bolesti hlavy a ospalost (Gillam et al., 2006).

Alternativou k DA jsou somatostatinová analoga (SSA). Jejich roli určují v hypofýze somatostatinové receptory. Všechny 5 subtypů je přítomno v hypofýze a v hypofyzárních tumorech (Hofland a Lamberts, 2001). U KAA se setkáme s vyšší expresí podtypu 3 (sst3) a sst2 (Taboada et al., 2007). Ostatní podtypy jsou zastoupeny méně. V současné době užívaná somatostatinová analoga (SA) jsou depotní formy octreotidu a lanreotidu, které mají největší afinitu pro sst2 a sst5 a o něco nižší k sst3. Zdá se, že právě afinita jednotlivých SA hraje klíčovou roli ve výsledném účinku na buňky tumoru. S octreotidem provedené studie mají rozporuplné výsledky a ne tak dobré jako u GH secernujících adenomů. V porovnání s dopaminovými agonisty dochází k redukci tumorózní masy u KAA při použití SSA pouze ve 12 % (Colao et al., 2008a). Růst tumoru nelze zcela přesně hodnotit vzhledem k velmi krátké době sledování, ale docházelo k němu asi v 5 %. Lze předpokládat ovšem hodnotu vyšší. Zajímavý je dosud nevysvětlený příznivý rychlý účinek na bolesti hlavy a zrakové obtíže, který si Lamberts vysvětluje přímým efektem na sítnici a zrakový nerv (Lamberts et al., 1995). Vzhledem k převaze sst3 je možné, že další analog pasireotid s vazbou na sst1-3 a sst5 by mohl mít větší efekt. Mechanismus účinku pasireotidu u KAA na růst tumoru se předpokládá v inhibici cévního endotelového růstového faktoru právě cestou aktivace somatostatinových receptorů (Zatelli et al., 2007).

Vzhledem ke koexpresi obou typů receptorů a se znalostí heterodimerizace sst5 a D2 (Rocheville, et al. 2000) se otevírá cesta k novým terapeutickým možnostem. Celkově je k dispozici zatím velmi málo dat. *In vivo* studii s kombinací DA a SSA provedl Andersen, který sledoval pacienty 6 měsíců na kombinaci octreotidu (200ug 3xd) a kabergolinu (0,5 mg/d) (Andersen et al., 2001). Ke zmenšení tumoru o více jak 10 % došlo u 6 pacientů z 10. Nové možnosti léčby se očekávají od dopastatinů, tedy molekul vázajících sst i DR. Klinická data však zatím nejsou. Pozitivní motivací k dalšímu výzkumu je výsledek práce Florio, kdy k inhibici růstu buněčné kultury KAA došlo v 60% a potvrdil, že dopastatin (BIM23A760) působí opravdu přes oba typy receptoru současně (Florio et al., 2008). Nebyl však *in vitro* účinnější než samotný kabergolin.

ZÁVĚR

Klinicky afunkční adenomy představují přibližně třetinu všech adenomů hypofýzy. Neurochirurgické odstranění je léčbou první volby pro expanzivně se chovající makroadenomy. Léčba recidivy je však stále předmětem debat a výzkumu. Pro rutinní použití DA či SSA u klinicky afunkčních adenomů zatím chybí dostatek důkazů a je potřeba dalších studií a vývoje efektivnějších analog. V léčbě recidivy či rostoucího zbytku KAA při expresi dopaminových anebo somatostatinových receptorů a současně citlivých na medikamentózní léčbu by bylo použití těchto analog zcela jistě elegantní alternativou současně používané radioterapie.

Práce byla podpořena projektem GAUK 79008.

LITERATURA

- Acunzo J, Saveanu A, Gerard C, Enjalbert A & Barlier A. [Mechanisms of pituitary tumorigenesis]. *Presse Med* 2009; 38: 76-83.
- Alexander JM, Biller BM, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A & Klibanski A. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* 1990; 86: 336-340.
- Andersen M, Bjerre P, Schroder HD, Edal A, Hoiland-Carlsen PF, Pedersen PH & Hagen C. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54: 23-30.
- Bergstrom M, Muhr C, Lundberg PO & Langstrom B. PET as a tool in the clinical evaluation of pituitary adenomas. *J Nucl Med* 1991; 32: 610-615.
- Bevan JS & Burke CW. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986; 25: 561-572.
- Bogazzi F, Buralli S, Manetti L, Raffaelli V, Cigni T, Lombardi M, Borelli F, Taddei S, Salvetti A & Martino E. Treatment with low doses of cabergoline is not associated with increased prevalence of cardiac valve regurgitation in patients with hyperprolactinaemia. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1864-1869.
- Burrow GN, Wortzman G, Rewcastle NB, Holgate RC & Kovacs K. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. *N Engl J Med* 1981; 304: 156-158.
- Caron P. [Clinically non functioning pituitary adenomas and gonadotroph-cell adenomas]. *Presse Med* 2009; 38: 103-106.
- Colao A, Di Somma C, Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G & Savastano S. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2008a; 15: 905-915.
- Colao A, Galderisi M, Di Sarno A, Pardo M, Gaccione M, D'Andrea M, Guerra E, Pivonello R, Lerro G & Lombardi G. Increased prevalence of tricuspid regurgitation in patients with prolactinomas chronically treated with cabergoline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008b; 93: 3777-3784.
- Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA & Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4769-4775.
- de Herder WW, Reijns AE, de Swart J, Kaandorp Y, Lamberts SW, Krenning EP & Kwekkeboom DJ. Comparison of iodine-123 epidepride and iodine-123 IBZM for dopamine D2 receptor imaging in clinically non-functioning pituitary macroadenomas and macroprolactinomas. *Eur J Nucl Med* 1999; 26: 46-50.
- de Herder WW, Reijns AE, Kwekkeboom DJ, Hofland LJ, Nobels FR, Oei HY, Krenning EP & Lamberts SW. In vivo imaging of pituitary tumours using a radiolabelled dopamine D2 receptor radioligand. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 45: 755-767.
- Dekkers OM, Hammer S, de Keizer RJ, Roelfsema F, Schutte PJ, Smit JW, Romijn JA & Pereira AM. The natural course of non-functioning pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 2007; 156: 217-224.
- Dekkers OM, Pereira AM & Romijn JA. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3717-3726.
- Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML & McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004; 101: 613-619.
- Ferone D, Lastoria S, Colao A, Varrella P, Cerbone G, Acampa W, Merola B, Salvatore M & Lombardi G. Correlation of scintigraphic results using 123I-methoxybenzamide with hormone levels and tumor size response to quinagolide in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 248-252.
- Ferone D, Pivonello R, Resmini E, Boschetti M, Rebora A, Albertelli M, Albanese V, Colao A, Culler MD & Minuto F. Preclinical

- and clinical experiences with the role of dopamine receptors in the treatment of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007; 156 Suppl 1: S37-43.
19. Ferrante E, Ferraroni M, Castrignano T, Menicatti L, Anagni M, Reimondo G, Del Monte P, Bernasconi D, Loli P, Faustini-Fustini M, Borretta G, Terzolo M, Losa M, Morabito A, Spada A, Beck-Peccoz P & Lania AG. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 823-829.
 20. Florio T, Barbieri F, Spaziante R, Zona G, Hofland LJ, van Koetsveld PM, Feelders RA, Stalla GK, Theodoropoulou M, Culler MD, Dong J, Taylor JE, Moreau JP, Saveanu A, Gunz G, Dufour H & Jaquet P. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 583-596.
 21. Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G & Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev* 2006; 27: 485-534.
 22. Greenman Y. Dopaminergic treatment of nonfunctioning pituitary adenomas. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3: 554-555.
 23. Greenman Y, Ouaknine G, Veshchev I, Reider G, Il, Segev Y & Stern N. Postoperative surveillance of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: markers of tumour quiescence and regrowth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58: 763-769.
 24. Hall WA, Luciano MG, Doppman JL, Patronas NJ & Oldfield EH. Pituitary magnetic resonance imaging in normal human volunteers: occult adenomas in the general population. *Ann Intern Med* 1994; 120: 817-820.
 25. Hofland LJ & Lamberts SW. Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 2: S31-36.
 26. Chong BW, Kucharczyk W, Singer W & George S. Pituitary gland MR: a comparative study of healthy volunteers and patients with microadenomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994; 15: 675-679.
 27. Jaffe CA. Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary* 2006; 9: 317-321.
 28. Kars M, Delgado V, Holman ER, Feelders RA, Smit JW, Romijn JA, Bax JJ & Pereira AM. Aortic valve calcification and mild tricuspid regurgitation but no clinical heart disease after 8 years of dopamine agonist therapy for prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008a; 93: 3348-3356.
 29. Kars M, Pereira AM, Bax JJ & Romijn JA. Cabergoline and cardiac valve disease in prolactinoma patients: additional studies during long-term treatment are required. *Eur J Endocrinol* 2008b; 159: 363-367.
 30. Katznelson L, Alexander JM & Klibanski A. Clinical review 45: Clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1089-1094.
 31. Koga M, Nakao H, Arao M, Sato B, Noma K, Morimoto Y, Kishimoto S, Mori S & Uozumi T. Demonstration of specific dopamine receptors on human pituitary adenomas. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987; 114: 595-602.
 32. Lamberts SJ, de Herder W, van der Lely AJ & Hofland J. Imaging and medical management of clinically nonfunctioning pituitary tumours. *Endocrinologist* 1995; 448-451.
 33. Lamberts SW & Macleod RM. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 1990; 70: 279-318.
 34. Lancellotti P, Livadariu E, Markov M, Daly AF, Burlacu MC, Betea D, Pierard L & Beckers A. Cabergoline and the risk of valvular lesions in endocrine disease. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 1-5.
 35. Marek J. Incidentalomy v endokrinologii – hypofýza. *Interní Med.* 2001; 8: 358-362.
 36. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M & Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998; 78: 189-225.
 37. Molitch ME. Incidental pituitary adenomas. *Am J Med Sci* 1993; 306: 262-264.
 38. Muhr C, Bergstrom K, Grimelius L & Larsson SG. A parallel study of the roentgen anatomy of the sella turcica and the histopathology of the pituitary gland in 205 autopsy specimens. *Neuroradiology* 1981; 21: 55-65.
 39. Park P, Chandler WF, Barkan AL, Orrego JJ, Cowan JA, Griffith KA & Tsien C. The role of radiation therapy after surgical resection of nonfunctional pituitary macroadenomas. *Neurosurgery* 2004; 55: 100-106; discussion 106-107.
 40. Pivonello R, Matrone C, Filippella M, Cavallo LM, Di Somma C, Cappabianca P, Colao A, Annunziato L & Lombardi G. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1674-1683.
 41. Renner U, Arzberger T, Pagotto U, Leimgruber S, Uhl E, Muller A, Lange M, Weindl A & Stalla GK. Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1368-1375.
 42. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC & Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 2000; 288: 154-157.
 43. Schade R, Andersohn F, Suissa S, Haverkamp W & Garbe E. Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Engl J Med* 2007; 356: 29-38.
 44. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimaraes RF, Marcondes JB, Chimelli LM, Fontes R, Mata PJ, Filho PN, Carvalho DP, Kineman RD & Gadelha MR. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007; 156: 65-74.
 45. Vallette S, Serri K, Rivera J, Santagata P, Delorme S, Garfield N, Kahtani N, Beaugard H, Aris-Jilwan N, Houde G & Serri O. Long-term cabergoline therapy is not associated with valvular heart disease in patients with prolactinomas. *Pituitary* 2008;
 46. Wakil A, Rigby AS, Clark AL, Kallvikbacka-Bennett A & Atkin SL. Low dose cabergoline for hyperprolactinaemia is not associated with clinically significant valvular heart disease. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: R11-14.
 47. Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesi S & Pezzoli G. Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 39-46.
 48. Zatelli MC, Piccin D, Vignali C, Tagliati F, Ambrosio MR, Bondanelli M, Cimino V, Bianchi A, Schmid HA, Scanarini M, Pontecorvi A, De Marinis L, Maira G & degli Uberti EC. Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 91-102.

MUDr. Filip Gabalec
2. interní klinika – OKH
FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: gabalec@fnhk.cz

Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas

**Filip Gabalec, Martin Beranek,
David Netuka, Vaclav Masopust, Jiri
Nahlovsky, Tomas Cesak, Josef Marek &
Jan Cap**

Pituitary

The Official Journal of the Pituitary Society

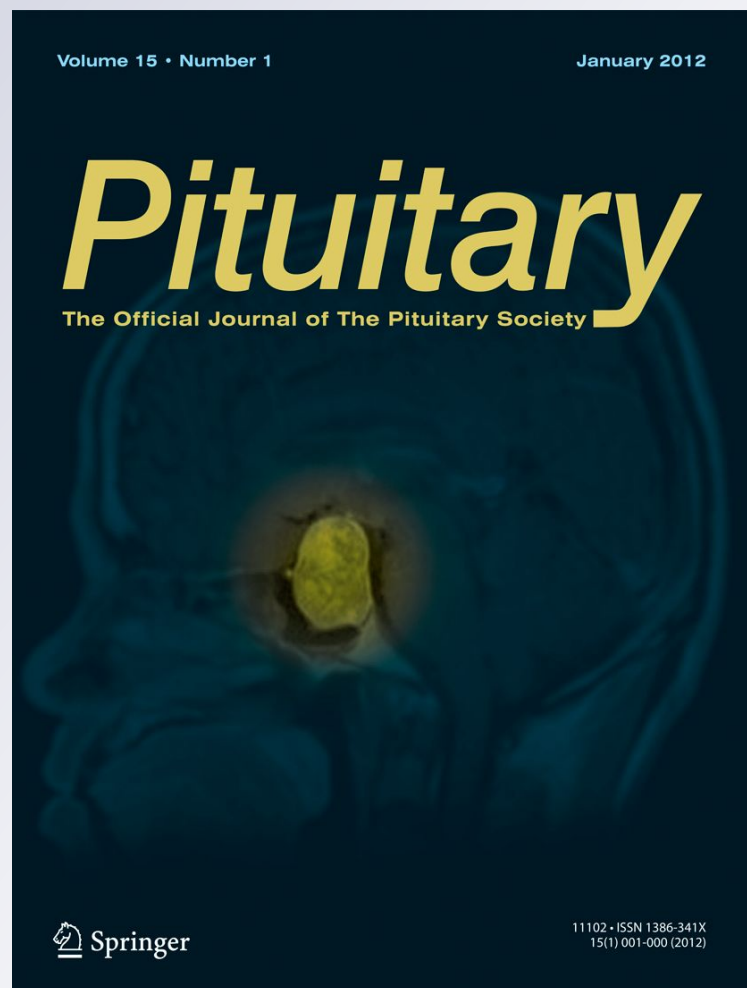
ISSN 1386-341X

Volume 15

Number 2

Pituitary (2012) 15:222-226

DOI 10.1007/s11102-011-0316-1



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas

Filip Gabalec · Martin Beranek · David Netuka ·
Vaclav Masopust · Jiri Nahlovsky · Tomas Cesak ·
Josef Marek · Jan Cap

Published online: 20 May 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Clinically non-functioning pituitary adenomas account for about one-third of pituitary tumors. The majority of them are pathologically classified as gonadotropinomas or null-cell adenomas without hormonal expression. The rest represent silent corticotroph adenomas and plurihormonal tumors. Conservative therapy with dopamine agonists is effective in some cases only depending on the expression of dopamine 2 receptors (D2R). The aim of this study was to quantitatively estimate D2R expression in clinically non-functioning pituitary adenomas and correlate the results with adenoma type according to pathological classification. Out of the 87 adenomas investigated, 63 expressed gonadotropins, 7 were silent corticotroph adenomas, 7 were plurihormonal tumors, and only 6 did not express any pituitary

hormone on immunohistochemical investigation. With the use of the reverse transcriptase PCR technique, D2R mRNA was expressed in all adenomas with very heterogeneous quantity. The expression was very low in corticotroph adenomas (relative median quantity after normalization to housekeeping gene 0.01) and lower in plurihormonal tumors (median 0.4) than in gonadotroph (median 1.3) and null-cell adenomas (median 1.9). The difference between corticotroph adenomas and plurihormonal tumors in comparison with other pathological types was statistically significant. The expression of D2R did not depend on the presence or absence of gonadotropins. We conclude that D2R expression is very low in corticotroph adenomas and significantly lower in plurihormonal tumors. The positivity of gonadotropins does not predict the D2R quantity.

F. Gabalec (✉) · J. Cap
Second Department of Internal Medicine, Charles University
Faculty of Medicine and Teaching Hospital in Hradec Králové,
Sokolská 581, 50005 Hradec Králové, Czech Republic
e-mail: gabalec@fnhk.cz; gabaf@seznam.cz

M. Beranek
Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Charles
University Faculty of Medicine and Teaching Hospital in Hradec
Kralove, Hradec Králové, Czech Republic

J. Nahlovsky · T. Cesak
Department of Neurosurgery, Charles University
Faculty of Medicine and Teaching Hospital in Hradec Kralove,
Hradec Králové, Czech Republic

D. Netuka · V. Masopust
Department of Neurosurgery, 1st Faculty of Medicine, Charles
University in Prague and Central Military Hospital Prague,
Prague, Czech Republic

J. Marek
3rd Department of Medicine, 1st Faculty of Medicine,
Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Keywords Dopamine D2 receptor · Clinically
non-functioning adenomas · Pituitary adenomas ·
Immunohistochemistry · Real-time PCR

Introduction

The prevalence of clinically non-functioning pituitary adenomas (NFPAs) is variously reported as between 15% and 45% of human pituitary tumors. NFPAs are characterized by the lack of symptoms of hormone hypersecretory syndromes and typically present with signs of mass effect when the tumor has reached the stage of a macroadenoma [1]. Some adenomas do not produce any hormones: null-cell adenomas and oncocytomas. The majority do synthesize and store pituitary hormones, especially LH, FSH, or their α -subunit, and are classified as gonadotropinomas [2]. Conjunctly, these 2 types comprise 85% of operated NFPAs. The remaining 15% of NFPAs are silent adenomas, which

express hormones as detected by immunohistochemistry, but do not secrete them in sufficient quantity to cause hormone-related clinical symptoms [3]. Although silent GH, prolactin, and TSH tumors have been reported, the majority express ACTH [4]—silent corticotroph adenomas.

Transsphenoidal surgery is the primary option for NFPAs requiring treatment. However, because of frequent supra— or parasellar extension, surgery is infrequently curative, leaving tumor remnants that regrow in 12 to 58% of patients within 5 years of follow-up [5]. The results of primary medical treatment of NFPAs with dopamine agonists have been rather disappointing thus far, except for some case reports [6]. This is probably due to the variability in D2R expression. However, the D2R is expressed in the majority of NFPAs [7] and dopamine agonists (mainly cabergoline) have been evaluated to treat postoperatively patients with residual NFPA in two studies with promising results. Pivonello et al. [8] observed tumor shrinkage (more than 25%) in 56% of patients after 1 year of cabergoline treatment at the dose of 3 mg/week, which was significantly correlated with DR2 expression. Greenman et al. [9] showed that tumor mass reduced or remained stable in 90% of cases in whom dopamine agonist therapy, including cabergoline, was started ahead detection of residual mass on postoperative magnetic resonance imaging; tumor growth stabilized or decreased in 61.5% of patients in whom DA treatment was initiated when tumor residue growth became evident during the follow-up.

The aim of this study was to determine the quantitative expression of D2R in a large series of NFPAs and correlate the results with the pathological classification of adenomas.

Patients and methods

The diagnosis of clinically non-functioning adenoma was based on the absence of hypersecretory laboratory markers—namely, the IGF-I level was normal or low for the particular age, and the serum prolactin level was normal or only slightly elevated to a level considered appropriate to stalk compression seen on MRI. Urinary free cortisol was not elevated. Serum free thyroid hormones were normal or lower. The diagnosis of adenoma was confirmed by pathological investigation after surgery, and 1 patient with a pathological diagnosis of oligodendroglioma was excluded.

Altogether, 87 patients were enrolled into the study. All signed an informed consent form, and the study was approved by the Ethics Committee. The participants were 55 men and 32 women, in the age range of 17–84 years (mean \pm standard deviation 59.4 ± 14.1). All tumors were macroadenomas; the largest diameter ranged from 11 to 42 mm (mean \pm standard deviation 24 ± 7 mm, median 24 mm). The major indication for operation were bitemporal hemianopsia or visual defect in 47 cases (54%), diplopia due to nerve palsy in 16 cases (18%),

progression of tumor growth on MRI in 27 (31%) and headache in 6 (7%). Before surgery 25 (29%) of patients had panhypopituitarism and were substituted with thyroxin and hydrocortisone, diabetes insipidus was present in 2 cases.

Of 32 women 29 were postmenopausal and were not treated with hormone replacement therapy. Two of the three premenopausal women were hypogonadal and were substituted with estrogen. Hypogonadism was diagnosed in 26 of 55 men, 14 of them received testosterone substitution before surgery.

Pathology

The tissue specimens were investigated as previously described [10]. Adenoma tissue specimens obtained at surgery were immediately fixed in 10% formalin, routinely processed, and subsequently embedded in paraffin. Sections 5 μ m thick were stained with hematoxylin-eosin and Goldberg's trichrome. The Gömöri silver impregnation of reticulin was used to enhance staining of fibrous tissue. For immunohistochemistry (IHC), serial sections from the same paraffin blocks were usually exposed to a heat-mediated antigen retrieval procedure in citrate buffer, pH 6.0, using a microwave oven. These pituitary hormones were investigated: ACTH (N-terminal specific rabbit antiserum of our own production); GH; prolactin; and specific β -subunits of the dimeric glycoproteins TSH, FSH, LH, and their common α -subunit (monoclonal antibodies, IMMUNOTECH Prague). The avidin–biotin technique and diaminobenzidine staining were used. The expression of individual hormones was described semiquantitatively in 4 stages: 0—absolutely negative, 1—slight positivity in less than 15% of cells, 2—positivity in 15–70% of cells, and 3—strong positivity in more than 70% of cells.

For RT–PCR analysis, small tissue samples were immediately stored in RNAlater (Qiagen[®]) according to the manufacturer instructions and frozen at -80°C for RNA stabilization.

Quantitative real-time RT–PCR

After defrosting, tissue samples were homogenized in a MagnaLyser using MagnaLyser green Beads (both Roche Diagnostics), and total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). The purity and quantity of RNA extracts was measured spectrophotometrically with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

Reverse transcription (Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix, Invitrogen) of optimized concentration of RNA was performed. The reaction mixture (25 μ l) for real-time PCR quantification contained, 12.5 μ l TaqMan

Table 1 Primer and probe sequences used for quantitative real-time RT-PCR

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

Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer, 200 nM probe, and 5 μ l of cDNA. Sequences of both primers and hydrolytic probe (TIB MolBiol) are shown in Table 1. The probe and primers were published previously [11] and cover the nucleotide sequences of both D2 receptor short and long splice variants. Fifty PCR cycles composed of 15 s denaturation at 95°C and 60 s annealing and elongation at 60°C were performed on a Rotor-Gene 6000, Corbett. All experiments were performed in doublets.

The standard curve for quantification of D2R RNA was constructed using a serial dilution of TOPO plasmid vector containing a part of D2 receptor nucleotide sequence (Generi Biotech, Czech Republic). Taking into account RNA degradation processes, the quantity of D2 receptor RNA molecules was consequently normalized to the β glucuronidase (GUS) housekeeping gene (Ipsogene).

Statistics

The quantity of mRNA coding D2 receptor was expressed both absolutely, in copies per 5 μ l of cDNA, and relatively, as the ratio of D2 receptor to housekeeping gene copies. The distribution of values in both the whole sample and groups divided according to the immunocytochemical classification proved to be non-Gaussian using Kolmogorov–Smirnov test (with Lilliefors' correction). For this reason, the groups were characterized by median and percentiles and Mann–Whitney rank sum test was used to evaluate differences between individual groups. The comparison was also done with the use of Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks (Dunn's method) with the same results. SigmaStat version 3.5 software (Systat Software, San Jose, California) was used.

Results

Immunohistochemical characteristics

Pathological classification of tumors is summarized in Table 2.

In 4 cases, the classification was unclear, and there was not enough material for repeating IHC. These adenomas were excluded from the study. In the majority of cases, adenomas exhibited at least slight positivity of glycoprotein hormones

Table 2 Classification of adenomas according to expression of pituitary hormones in immunohistochemical investigation

Adenoma type	Number	%
Non-classified/insufficient ICC	4	
Gonadotroph	63	75.9
Null-cell tumor	6	7.2
Silent corticotroph	7	8.4
Plurihormonal	7	8.4

LH, FSH, or their α -subunit. There were 7 silent corticotroph adenomas and 7 plurihormonal tumors. Plurihormonal adenomas expressed LH, FSH, and/or their α -subunit in all cases, together with ACTH, PRL, and TSH in various combinations.

Dopamine D2 receptor mRNA expression

Five of 87 NFPAs specimens that expressed less than 100 copies/5 μ l cDNA of housekeeping gene were excluded from the study. All 78 evaluated NFPAs expressed the D2R mRNA. High variability in the D2R mRNA expression was present (Fig. 1). The D2R mRNA levels varied from 0.93 to 1.689.137 copies/5 μ l cDNA and from 0.003 to 14.860 after normalization to the GUS gene, respectively. Coefficients of variation reflecting the imprecision of measurements in doublets moved from 0.02 to 1.02%.

Relation of dopamine D2 receptor expression to pathological classification

The expression of D2R was universally very low in pure silent corticotroph adenomas (median relative expression 0.01). In other adenoma types, the expression was 0.4 in plurihormonal tumors, 1.3 in gonadotroph adenomas, and 1.9 in adenomas without any hormone detected. The difference between silent corticotroph adenoma and any other type was highly statistically significant in the Mann–Whitney rank-sum test ($P = 0.003$).

Lower expression of D2R was found in plurihormonal tumors than in null-cell and gonadotroph adenomas ($P = 0.036$ in Mann–Whitney rank-sum test). However, after exclusion of corticotroph adenomas, no difference was observed in tumors with and without gonadotropin hormone expression (Fig. 2).

Discussion

The immunohistochemical evaluation found gonadotropin hormones positivity in 76% of tumors. This is greater than the frequency of gonadotroph adenomas found in the large series of the German Registry [3]. The possible explanation

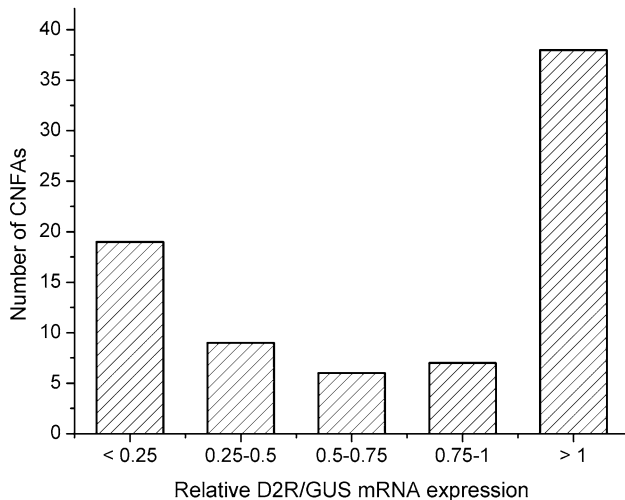


Fig. 1 Numbers of non-functioning pituitary adenomas divided into groups according to their relative D2R/GUS mRNA expression. Eighteen NFPAs showed low expression; in 22 NFPAs (9, 6, and 7, respectively), expression varied between 0.25 and 1 after normalization to the GUS gene, and 38 NFPAs showed high relative expression of D2R mRNA

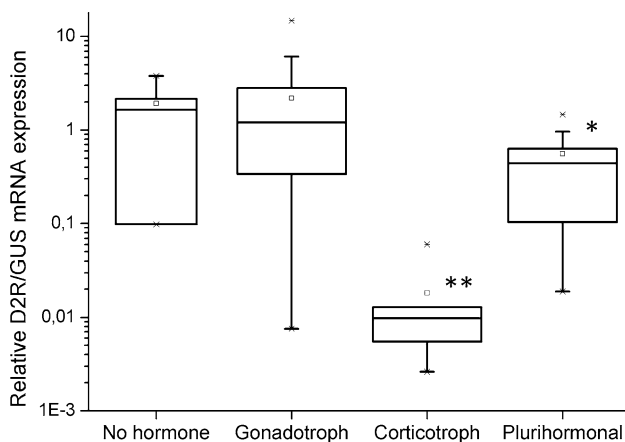


Fig. 2 Relative expression of D2R normalized on GUS in individual pathology types of non-functioning pituitary adenomas. The *upper border* of the *box* represents the 75th percentile, and the *lower border* represents the 25th percentile of the distribution. The median is represented by a *line* within the *box*. The whiskers of the plot represent the 99th percentile range, and the small *square* represents the arithmetic mean and crosses extreme values. The difference between silent corticotroph adenoma and any other type was highly statistically significant ($P = 0.003$). Lower expression of the D2 receptor was found in plurihormonal tumors than in null-cell and gonadotroph adenomas ($P = 0.036$) in the Mann–Whitney rank-sum test. Statistical significance of difference: ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

is that no electron-microscopic evaluation was performed in this study. Slight glycoprotein hormone positivity in less than 10% of cells can be observed in null-cell adenomas. Indeed, most oncocytomas and null-cell adenomas belong to the gonadotroph adenoma family, as they express steroidogenic factor 1 (SF-1), a transcription factor with pituitary expression specific to the gonadotroph lineage

[12]. The proportion of silent corticotroph and plurihormonal adenomas is in agreement with other series [2].

Dopamine receptors are encoded by 5 separate genes (DR1-5) in which the D2R subtype exists as 2 variants (long and short) generated by alternative splicing. In normal human pituitaries receptors of types 2 and 5 are expressed, with predomination of type 2. Type 3 is not present, and the expression of types 1 and 4 is low. However in NFPAs dopamine receptors of type 2 and type 4 are expressed and the expression of type 1 and 5 is low [7]. In our study we have examined D2R, because of its highest expression and principal role in dopamine agonist treatment.

In the normal pituitary, the D2R mediates the tonic inhibitory control of prolactin secretion by dopamine [13], and in prolactinomas, drugs acting on D2R levels are able to reduce the size of the tumors and control PRL excess. Ligand-binding studies and scintigraphic evaluations have shown the presence of dopamine-binding sites in NFPAs [14, 15]. More recently, RT–PCR was used to quantify mRNA for various types of dopamine receptors. Pivonello et al. [8] found D2R expression in 12 of 18 NFPAs (67%) studied, with predominance of the D2R long isoform. We have observed expression of D2R in all adenomas studied. This is in keeping with the findings of other recent studies [7, 16].

The aim of our study was to correlate D2R expression with the pathological adenoma type, determined on the basis of immunohistochemical investigation of pituitary hormones. Renner et al. [17] reported that nearly all gonadotropin-immunopositive adenoma cells expressed D2R mRNA, as detected by the in situ hybridization technique. We therefore expected higher D2R expression in adenomas strongly positive for LH, FSH, and α -subunit. However, in this large series, we were not able to find any significant relationship between the quantity of D2R and the presence of gonadotropin hormones. Very low expression of D2R was universally found in silent corticotroph adenomas. This confirms the results of Tateno et al. [18].

Conservative therapy of non-functioning pituitary adenomas with dopamine agonists is still experimental. The cumulative evidence shows tumor shrinkage in 27.6%, and the rate of tumor regrowth is 8.5% [6]. Postoperative treatment can prevent residual tumor enlargement after surgery [9]. The effect of dopamine agonist therapy depends on the quantity of D2R present, with the short D2R variant predisposing the most favorable outcomes [8]. The results of this study indicate that the presence of D2R can be assumed on the basis of pathological adenomas classification only in silent corticotroph adenomas, in which the expression is universally very low. Plurihormonal tumors, which are usually large and aggressive, had statistically significantly lower expression as well. The majority of adenomas are gonadotropinomas and null-cell adenomas, in which the expression of glycoprotein hormones does not predict the D2R quantity and treatment response.

Acknowledgment This work was supported by Charles University Grant Agency 79008 and Ministry of Health's Grant Agency NT11344-4/2010.

Conflict of interest Filip Gabalec, Martin Beranek, David Netuka, Vaclav Masopust, Jiri Nahlovsky, Tomas Cesak, Jan Cap have nothing to declare.

References

- Jaffe CA (2006) Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary* 9(4):317–321. doi:10.1007/s11102-006-0412-9
- Osamura RY, Kajiya H, Takei M, Egashira N, Tobita M, Takekoshi S, Teramoto A (2008) Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol* 130(3):495–507. doi:10.1007/s00418-008-0472-1
- Saeger W, Ludecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S (2007) Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German pituitary tumor registry. *Eur J Endocrinol* 156(2):203–216. doi:10.1530/eje.1.02326
- Greenman Y, Stern N (2009) Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23(5):625–638. doi:10.1016/j.beem.2009.05.005
- Brochier S, Galland F, Kujas M, Parker F, Gaillard S, Raftopoulos C, Young J, Alexopoulou O, Maiter D, Chanson P (2010) Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients. *Eur J Endocrinol* 163(2):193–200. doi:10.1530/EJE-10-0255
- Colao A, Di Somma C, Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G, Savastano S (2008) Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 15(4):905–915. doi:10.1677/ERC-08-0181
- Neto LV, Machado Ede O, Luque RM, Taboada GF, Marcondes JB, Chimelli LM, Quintella LP, Niemeyer P Jr, de Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR (2009) Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 94(6):1931–1937. doi:10.1210/jc.2008-1826
- Pivonello R, Matrone C, Filippella M, Cavallo LM, Di Somma C, Cappabianca P, Colao A, Annunziato L, Lombardi G (2004) Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 89(4):1674–1683
- Greenman Y, Tordjman K, Osher E, Veshchev I, Shenkerman G, Reider G II, Segev Y, Ouaknine G, Stern N (2005) Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63(1):39–44. doi:10.1111/j.1365-2265.2005.02295.x
- Cap J, Cerman J, Nemecek S, Marekova M, Hana V, Frysak Z (2003) The influence of treatment with somatostatin analogues on morphology, proliferative and apoptotic activity in GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Neurosci* 10(4):444–448. doi:S0967586803000729
- O'Toole D, Saveanu A, Couvelard A, Gunz G, Enjalbert A, Jaquet P, Ruzsniowski P, Barlier A (2006) The analysis of quantitative expression of somatostatin and dopamine receptors in gastro-entero-pancreatic tumours opens new therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol* 155(6):849–857. doi:10.1530/eje.1.02307
- Al-Shraim M, Asa SL (2006) The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: what is new? *Acta Neuropathol* 111(1):1–7. doi:10.1007/s00401-005-1093-6
- Lamberts SW, Macleod RM (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 70(2):279–318
- Bevan JS, Burke CW (1986) Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 25(5):561–572
- Ferone D, Lastoria S, Colao A, Varrella P, Cerbone G, Acampa W, Merola B, Salvatore M, Lombardi G (1998) Correlation of scintigraphic results using 123I-methoxybenzamide with hormone levels and tumor size response to quinagolide in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 83(1):248–252
- Nishioka H, Tamura K, Iida H, Kutsukake M, Endo A, Ikeda Y, Haraoka J (2011) Co-expression of somatostatin receptor subtypes and estrogen receptor-alpha mRNAs by non-functioning pituitary adenomas in young patients. *Mol Cell Endocrinol* 331(1):73–78. doi:10.1016/j.mce.2010.08.011
- Renner U, Arzberger T, Pagotto U, Leimgruber S, Uhl E, Muller A, Lange M, Weindl A, Stalla GK (1998) Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 83(4):1368–1375
- Tateno T, Kato M, Tani Y, Oyama K, Yamada S, Hirata Y (2009) Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas. *Endocr J* 56(4):579–584. doi:JST.JSTAGE/endocrj/K08E-186

Chlopenní vady při léčbě hyperprolaktinémie dopaminovými agonisty

Filip Gabalec, Jan Čáp, Jakub Radocha

IV. interní hematologická klinika LF UK a FN Hradec Králové

Souhrn

Nežádoucí vliv účinku dopaminových agonistů na srdeční chlopně vzbudil v jednu dobu nebývalý ohlas. Postupně s přibývajícím daty došlo k racionalizaci přístupu a indikaci dalších vyšetření jen v **jednoznačně opodstatněných** případech. Článek shrnuje současné znalosti o léčbě hyperprolaktinémie dopaminovými agonisty a riziku vzniku vady srdeční chlopně.

Klíčová slova: agonisté dopaminu – ergolinové deriváty/nežádoucí účinky – hyperprolaktinémie – chlopenní vady – nádory hypofýzy – prolaktinom

Valvular heart disease in relation to the treatment of hyperprolactinemia with dopamine agonists

Summary

Adverse effect of dopamine agonists on the heart valves aroused much attention some time ago. Gradually, as data accumulated, the approach to the problem was rationalised and further examinations were only recommended in indicated cases. The paper reviews the current knowledge about the treatment of hyperprolactinemia with dopamine agonists and the risk of valvular disease.

Key words: dopamine agonists – ergolines/adverse effects – heart valve diseases – hyperprolactinemia – pituitary neoplasms – prolactinoma

Úvod

Zvýšené riziko onemocnění srdečních chlopní ve smyslu fibrotizace chlopenní tkáně bylo zaznamenáno v roce 2006 u nemocných s Parkinsonovou chorobou léčených vysokými dávkami od ergotaminu odvozených agonistů dopaminu, jako je např. kabergolin a pergolid [1]. Evropská léková agentura (EMA) a následně Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) doporučily v roce 2008 doplnit texty doprovázející léčivé přípravky ze skupiny ergotaminových dopaminových agonistů o nová upozornění a kontraindikace týkající se rizika fibrotizace srdečních chlopní. Tato se projevuje zejména jako insuficience chlopně. U Parkinsonovy choroby existuje korelace mezi kumulativní dávkou agonistů dopaminu (DA) a závažností regurgitace srdeční chlopně. Na tu upozornil Schade et al, který z dat z registru ve Velké Británii potvrdil na rozsáhlé skupině nemocných s Parkinsonovou chorobou signifikantní zvýšení rizika poškození trikuspidální chlopně s následnou trikuspidální regurgitací při podávání dávky vyšší než 3 mg pergolidu nebo kabergolinu [2]. K obdobným závěrům došel i Zanettini [3]. Od 90. let minulého století

se stal kabergolin lékem 1. volby v léčbě hyperprolaktinémie [4]. Jeho běžné a rozšířené použití v endokrinní praxi vyvolalo otázky o jeho bezpečnosti při chronickém užívání, přestože je užíván v daleko nižších dávkách, než jsou DA užívány u Parkinsonovy nemoci. I přesto, že první výsledky studií jsou poměrně uklidňující, dat o dlouhodobém užívání kabergolinu a jeho vlivu na srdeční chlopně přibývá teprve postupně. Text níže se zabývá dosud dosaženým poznáním.

Preparáty dostupné na trhu v České republice

Skupina ergotaminových dopaminových agonistů zahrnuje následující látky: bromokriptin, kabergolin, dihydroergokriptin, lisurid a pergolid. Tyto látky se používají především k terapii Parkinsonovy choroby. V České republice jsou ze skupiny ergotaminových dopaminových agonistů pro terapii Parkinsonovy choroby **registrovány** následující přípravky:

- s účinnou látkou bromokriptin – Medocriptine, Parlodel
- s účinnou látkou kabergolin – nyní jen Dostinex (dříve Cabera, Cabergolin Sandoz, Cabergolin Arrow)

Již neregistrované přípravky:

- s účinnou látkou dihydroergokryptin – dříve Almirid
- s účinnou látkou pergolid – dříve Permax

Mechanismus nežádoucího účinku

Obecné negativní účinky dopaminových agonistů jsou dobře známé a jsou shrnuty v práci Gillamové [5]. V zásadě je lze rozdělit do 3 skupin:

gastrointestinální obtíže – nejčastěji nauzea, zvracení, zácpa

kardiovaskulární – posturální hypotenze

neurologické – bolesti hlavy a ospalost

Nověji poznaným nežádoucím účinkem je impulzivní porucha chování osobnosti jako patologické hráčství (gambling), hypersexualita, nárazové nakupování a přejídání se. Většina je popsána v neurologii při léčbě Parkinsonovy nemoci vyššími dávkami DA [6], méně pak je známo o vzniku těchto poruch u nemocných léčených pro hyperprolaktinémii [7].

Při dlouhodobém používání ergotaminových dopaminových agonistů je známým nežádoucím účinkem rozvoj fibrózy, především kardiální. Hodnocení nových poznatků o zvýšeném riziku fibrózy u pacientů dlouhodobě léčených ergotaminovými deriváty naznačuje, že rozvoj fibrózy může nastat mnohem dříve, než jsou patrné její příznaky. Cesta k poznání mechanismu nežádoucího účinku byla delší.

V roce 1997 Connolly et al popsal sérii 24 případů neobvyklé valvulopatie u nemocných léčených fenfluraminem a fenterminem, což byla v té době v USA používána anorektika [8]. U obou bylo známo, že pokud jsou používány samostatně, vedou k plicní hypertenzi. U všech pacientů pak byla při ultrasonografickém vyšetření srdce nalezena regurgitace a specifický obraz chlopně – zúžení předního cípu v pravé i levé atrioventrikulární chlopni. Fenfluramin vede ke zvýšeným hladinám serotoninu blokací pumpy pro jeho reuptake. Fentermin (derivát amfetaminu) pak stimuluje neuryony a udržuje vysoké hladiny neurotransmiterů (dopamin a noradrenalin). Podobný typ chlopenní vady byl popsán již dříve u karcinoidu [9,10].

V roce 2000 Rothman et al zjistili, že ke vzniku vady je třeba aktivace 2. podtypu 5-hydroxytryptaminového receptoru (5-HT_{2B}), který je vysoce exprimován v lidských srdečních chlopních [11]. V důsledku této aktivace vzniká mitogeneze a proliferace fibroblastů postupně vedoucí k valvulopatii [12,13]. Do buněčné signalizace po aktivaci 5-HT_{2B} receptoru je zahrnuta Ras-mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) a Src signální kaskáda, které způsobují proliferaci fibroblastů. Aktivace receptoru zvyšuje ukládání extracelulární komponenty, jako jsou glykosaminoglykany, což vede k formaci plátu na chlopenních cípech a ztlustění subvalvulárního aparátu. Tento proces časem vede k tuhosti cípů a retrakci šlašin. Výsledkem je zhoršená mobilita chlopně a špatná naléhání okrajů cípů chlopně vedoucí k regurgitaci [14].

Hyperprolaktinémie

Hyperprolaktinémie, přebytek sérového prolaktinu nad referenční laboratorní limit, je běžným problémem endokrinní praxe. Hyperprolaktinémie může být fyziologická, patologická nebo iatrogenní. Mezi příčiny přetrvávající nefyziologické hyperprolaktinémie (tj. vyskytující se mimo těhotenství nebo laktaci) patří léky, hypotyreóza a poruchy hypotalamu/hypofýzy. Rovněž vztah mezi některými léky, nejčastěji antipsychotiky, a hyperprolaktinemií je dobře znám. Mezi další léky se vztahem k hyperprolaktinemií patří některá antidepresiva, antiemetika a antihypertenziva. Hyperprolaktinémie může být vyvolána makroprolaktinem, který je výsledkem tvorby komplexů prolaktin-imunoglobulin. V tomto případě nejsou typické klinické příznaky kvůli omezené biologické dostupnosti a bioaktivitě. Nejčastější příčinou jsou prolaktinomy a ostatní adenomy hypofýzy (35–70 %) a idiopatická hyperprolaktinémie (28–46 %).

Agonisté dopaminu v léčbě hyperprolaktinémie

Agonisté dopaminových receptorů byli objeveni již v 70. letech 20. století. Využití DA k léčbě hyperprolaktinémie bylo založeno na faktu, že v hypotalamo-hypofyzárním systému dopamin tonicky inhibuje sekreci prolaktinu cestou dopaminových receptorů [15]. Samotný dopamin se váže na všechny podtypy dopaminových receptorů. Vazba DA na jednotlivé podtypy se pak mírně liší [16]. Stejně tak se liší jejich vazba na 5-HT_{2B} receptor, při níž kabergolin a pergolid mají vazbu velmi silnou, bromokriptin je parciální agonista a např. quinaolid nemá žádnou aktivitu. Během 90. let 20. století se stal v léčbě hyperprolaktinémie lékem 1. volby kabergolin, který je účinnější, má delší poločas, vyšší afinitu k D₂ receptoru a je lépe tolerován než bromokriptin [4,17]. Kabergolin pomáhá normalizovat hladiny prolaktinu u 73–96 % nemocných oproti 70–80 % nemocných užívajících bromokriptin [5]. Vede také k významnému zmenšení velikosti většiny prolaktinomů. Až 85 % nemocných rezistentních k bromokriptinu zareaguje na kabergolin. Nemocní rezistentní ke kabergolinu často reagují až na vyšší dávky. Skutečně rezistentní prolaktinomy jsou spíše vzácné, vyšší podíl je mezi těmi s genetickou komponentou onkogeneze (např. mutace v genu pro **arylhydrokarbonový receptor-interagující protein** (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein – AIP) [18]. Oproti bromokriptinu má kabergolin ještě tu výhodu, že jeho efekt přetrvává v konkrétních případech i po jeho vysazení až u jedné třetiny nemocných [19,20]. Kabergolin se používá v mnohem nižších dávkách než u Parkinsonovy nemoci, nejčastěji v dávce okolo 2 mg týdně rozdělných do několika dávek. S ohledem na to, že hyperprolaktinémie postihuje i mladší pacienty a léčba je chronická, může být dosaženo poměrně vysokých kumulativních dávek.

Léčba kabergolinem u hyperprolaktinémie a u Parkinsonovy choroby – stejné riziko chlopenní vady?

Užívání DA odvozených od ergotaminu byla věnována speciální pozornost. U nemocných léčených pro Parkinsonovu chorobu není o riziku plynoucím z podávání DA pochyb. Obě studie, které na problém upozornily, zároveň zdůraznily kumulativní efekt kabergolinu na riziko vzniku a závažnost chlopenní vady. Ve studii Schade et al bylo riziko vady vyšší při dávkách 3 mg na den a více a při léčbě delší než 6 měsíců. Zannettini pak potvrdil tuto hypotézu pro kumulativní dávku vyšší než 2 000 mg [2,3]. U jedné třetiny nemocných s vícečetným postižením a u poloviny s postižením jedné chlopně došlo po vysazení medikace k regresi nálezu [21]. Dávky užívané v léčbě hyperprolaktinémie, jak již bylo zmíněno, jsou nižší (0,5–2 mg/týden). Kumulativní dávky dosažené ve studiích u nemocných s hyperprolaktinemií pak byly desetnásobné (200–600 mg) oproti studiím s Parkinsonovou nemocí. Nemocní ve studiích jsou rovněž mladší, a mají tedy s ohledem na věk méně kardiovaskulárních rizik.

Od roku 2008 se problémem vztahu kabergolinu a vzniku chlopenních vad zabývalo několik studií. Většina z nich byly observační studie případů a kontrol u nemocných již léčených kabergolinem. Častěji byla ve studiích porovnávána funkce srdečních chlopní s kontrolní skupinou než oproti stavu chlopní před léčbou. Jedna z prvních observačních studií případů a kontrol byla práce Colao et al. V této práci porovnávali sonografické nálezy u pacientů s hyperprolaktinemií léčených kabergolinem s pacienty s nově vzniklou hyperprolaktinemií a kontrolami. Prevalence středně závažné trikuspidální insuficience byla 54% v léčené skupině, 18% u kontrol a žádná u nemocných s nově vzniklou hyperprolaktinemií. Relativní riziko (RR) dosáhlo hodnoty 3. Relativní riziko na ostatních chlopních bylo vyšší než 1, ale statisticky nevýznamné. Prevalence středně závažné trikuspidální insuficience byla 72% oproti 36% u nemocných léčených vyšší kumulativní dávkou (> 280 mg) [22]. Další studie nepotvrdily vyšší výskyt klinicky významné chlopenní vady [23–36]. Některé studie uvádějí vyšší výskyt mírné trikuspidální insuficience. Metaanalýza 8 výše uvedených studií ukázala poměr šancí – „odds ratio“ (OR) 1,92 pro mírnou až středně závažnou trikuspidální regurgitaci. I po vyloučení studie Colao zůstalo OR zvýšené – 1,7 [37]. Klinický význam těchto vad zůstává nejasný. Jedním z možných vysvětlení, proč je postižení právě trikuspidální chlopně, je vyšší denzita 5-HT_{2R} receptorů na této chlopně. Současně nebyla prokázána vyšší prevalence vady jiné chlopně. Zmíněné observační studie mají své limity. Časté je riziko selekčního bias a nadhodnocení vad při nezasepení případu pro kardiologa provádějícího ultrasonografické (USG) vyšetření. Kontroly jsou vybírány mezi zdravými jedinci než u nemocných s hyperprolaktinemií a neléčených kabergolinem. Prospektivních studií je velmi málo. Delgado et al sledovali

svou původní skupinu další 2 roky a poté znovu vyšetřili nemocné ultrasonograficky. Nepozoroval žádnou progresi již zjištěné chlopenní vady ani nárůst prevalence [38]. Auriemma et al sledovali 40 nemocných v léčbě kabergolinem (medián léčby 60 měsíců) a rovněž nezjistili vyšší výskyt stopové, mírné nebo klinicky signifikantní chlopenní vady po 2 a 5 letech léčby [39]. Velká skupina nemocných (192) byla sledována ve Velké Británii minimálně 2 roky. V této skupině byla převaha mužů a makroprolaktinomů. Medián kumulativní dávky mezi 1. a 2. USG vyšetřením byl 97 mg, respektive 232 mg. Nebyl potvrzen zvýšený výskyt chlopenních vad [40].

Recentně Vroonen et al provedli prospektivní sledování nemocných léčených pro prolaktinom a idiopatickou hyperprolaktinemií. Studie se účastnilo 100 nemocných, z toho 71 žen s mediánem věku 41,5 roku. 89 nemocných mělo prolaktinom, idiopatickou hyperprolaktinemií zbývajících 11. Medián mezi prvním a posledním USG vyšetřením byl 62,5 měsíce (34–77), medián celkové doby léčby kabergolinem pak byl 124,5 měsíce. Medián kumulativní dávky kabergolinu byl > 277 mg. Mezi nemocnými nebylo nalezeno klinicky relevantní poškození srdečních chlopní nebo kalcifikace [41].

Léčba kabergolinem u akromegalie, klinicky funkčních adenomů a Cushingova syndromu – výsledky studií

V některých případech je kabergolin využíván i v léčbě akromegalie [42] a Cushingovy choroby [43]. Jeho užití v léčbě klinicky afunkčních adenomů je sporné [44]. Ve studii, v níž bylo sledováno po dobu nejméně 4 let 52 akromegaliků (26 léčených kabergolinem), byla incidence chlopenní regurgitace a remodelace stejná u obou skupin. Ke změnám na srdci může docházet i vlivem nadbytku růstového hormonu, nebyla nalezena ani korelace s hladinami IGF1. U nemocných s Cushingovou chorobou nebo klinicky afunkčními adenomy nebyla doposud provedena žádná systematická studie.

Bromokriptin

Dat o bromokriptinu je velmi málo. Bromokriptin má daleko menší afinitu k 5-HT_{2B} receptoru, a tak se předpokládá, že by jeho vliv na vznik chlopenní vady měl být daleko menší. Nicméně existují kazuistická sdělení a hlášení v systému nežádoucích účinků o chlopenní regurgitaci o pleuropulmonální fibróze nemocných s Parkinsonovou nemocí léčených vysokými dávkami bromokriptinu. V jedné ze studií, kde bylo 19 nemocných s hyperprolaktinemií léčených bromokriptinem v průměru 54,8 měsíců, byla prevalence stopové trikuspidální insuficience vyšší než u kontrol, ale stejná jako při léčbě kabergolinem [25].

Kdy indikovat ultrasonografické vyšetření srdce?

Z bezpečnostních důvodů doporučuje Evropská léková agentura (European Medicines Agency) ultrasonografické vyšetření srdce u pacientů s prolaktinomem léče-

ných kabergolinem (2D echo) již na začátku léčby. Vyšetření se pak má opakovat po 3–6 měsících a následně v 6–12 měsíčním intervalu. Toto schéma nemá dostatečnou oporu v důkazech a vedlo by nejen v našich podmínkách k nadbytečným vyšetřením.

Doporučené postupy Endocrine Society pak navrhuji ultrasonografické vyšetření jen u nemocných užívajících vysoké dávky kabergolinu (> 3 mg/týden).

O selekci pacientů hovoří ve svém souhrnu i Americká asociace klinických endokrinologů (AAACE) [45]. Navrhuje ultrasonografické vyšetření **pouze** u nemocných se známým kardiovaskulárním onemocněním. S ohledem na vyšší frekvenci srdečních vad a absenci dat o nežádoucích účincích léčby kabergolinem ve vyšším věku mohou být kandidáty na vyšetření i nemocní starší 50 let. Dalším rizikovým faktorem mimo vysoké dávky kabergolinu je ještě hypertenze, která může potencovat vliv na vznik fibrózy.

Závěr

Kabergolin je v léčbě hyperprolaktinemie široce užívaný lék. Při jeho užití v léčbě prolaktinomů a akromegalie nebylo prokázáno zvýšené riziko významné chlopenní vady ani korelace s délkou léčby nebo kumulativní dávkou. U nemocných užívajících dávky kabergolinu > 3 mg/týden po dlouhou dobu je vhodné provedení ultrasonografického vyšetření srdce k posouzení chlopenních vad. Při typických dávkách kabergolinu 1–2 mg/týden je doporučovaný rutinní screening chlopenních vad sporný a posouzení je nutně individuálně. K eliminaci vysoké kumulativní dávky je vhodné zkusit v případech, v nichž je to možné, dlouhodobou léčbu přerušit.

Literatura

1. Nutt JG, Wooten GF. Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2005; 353(10): 1021–1027.
2. Schade R, Andersohn F, Suissa S et al. Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Engl J Med* 2007; 356(1): 29–38.
3. Zanettini R, Antonini A, Gatto G et al. Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2007; 356(1): 39–46.
4. dos Santos Nunes V, El Dib R, Boguszewski CL et al. Cabergoline versus bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemia: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *Pituitary* 2011; 14(3): 259–265. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11102-010-0290-z>>.
5. Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G et al. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev* 2006; 27(5): 485–534.
6. Moore TJ, Glenmullen J, Mattison DR. Reports of pathological gambling, hypersexuality, and compulsive shopping associated with dopamine receptor agonist drugs. *JAMA Intern Med* 2014; 174(12): 1930–1933. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.5262>>.
7. Andela CD, Scharloo M, Pereira AM et al. Quality of life (QoL) impairments in patients with a pituitary adenoma: a systematic review of QoL studies. *Pituitary* 2015; 18(5): 752–776. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11102-015-0636-7>>.
8. Connolly HM, Crary JL, McGoon MD et al. Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N Engl J Med* 1997; 337(9): 581–588. Erratum in *N Engl J Med* 1997; 337(24): 1783.
9. Pellikka PA, Tajik AJ, Khandheria BK et al. Carcinoid heart disease. Clinical and echocardiographic spectrum in 74 patients. *Circulation* 1993; 87(4): 1188–1196.
10. Robiolo PA, Rigolin VH, Wilson JS et al. Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* 1995; 92(4): 790–795.
11. Rothman RB, Baumann MH, Savage JE et al. Evidence for possible involvement of 5-HT(2B) receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* 2000; 102(23): 2836–2841.
12. Jahnichen S, Horowski R, Pertz HH. Agonism at 5-HT2B receptors is not a class effect of the ergolines. *Eur J Pharmacol* 2005; 513(3): 225–228.
13. Roth BL. Drugs and valvular heart disease. *N Engl J Med* 2007; 356(1): 6–9.
14. Hutcheson JD, Ryzhova LM, Setola V et al. 5-HT(2B) antagonism arrests non-canonical TGF-beta1-induced valvular myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53(5): 707–714. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmcc.2012.08.012>>.
15. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22(6): 724–763.
16. Pivonello R, Ferone D, Lombardi G et al. Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 2007; 156(Suppl 1): S13–S21. Erratum in *Eur J Endocrinol* 2007; 157(4): 543.
17. Molitch ME. Pituitary tumors: cabergoline versus bromocriptine: a meta-analysis? *Nature reviews. Endocrinology* 2011; 7(5): 254–255. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.33>>.
18. Vroonen L, Jaffrain-Rea ML, Petrossians P et al. Prolactinomas resistant to standard doses of cabergoline: a multicenter study of 92 patients. *Eur J Endocrinol* 2012; 167(5): 651–662. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-12-0236>>. Erratum in *Eur J Endocrinol* 2012; 167(6): 887.
19. Hu J, Zheng X, Zhang W et al. Current drug withdrawal strategy in prolactinoma patients treated with cabergoline: a systematic review and meta-analysis. *Pituitary* 2015; 18(5): 745–751. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11102-014-0617-2>>.
20. Dekkers OM, Lagro J, Burman P et al. Recurrence of hyperprolactinemia after withdrawal of dopamine agonists: systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(1): 43–51. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-1238>>.
21. Zanettini R, Antonini A, Gatto G et al. Regression of cardiac valvulopathy related to ergot-derived dopamine agonists. *Cardiovasc Ther* 2011; 29(6): 404–410. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00169.x>>.
22. Colao A, Galderisi M, Di Sarno A et al. Increased prevalence of tricuspid regurgitation in patients with prolactinomas chronically treated with cabergoline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(10): 3777–3784. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-1403>>.
23. Halperin I, Aller J, Varela C et al. No clinically significant valvular regurgitation in long-term cabergoline treatment for prolactinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77(2): 275–280. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04349.x>>.
24. Elenkova A, Shabani R, Kalinov K et al. Increased prevalence of subclinical cardiac valve fibrosis in patients with prolactinomas on long-term bromocriptine and cabergoline treatment. *Eur J Endocrinol* 2012; 167(1): 17–25. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-12-0121>>.
25. Boguszewski CL, dos Santos CM, Sakamoto KS et al. A comparison of cabergoline and bromocriptine on the risk of valvular heart disease in patients with prolactinomas. *Pituitary* 2012; 15(1): 44–49. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11102-011-0339-7>>.
26. Tan T, Cabrita IZ, Hensman D et al. Assessment of cardiac valve dysfunction in patients receiving cabergoline treatment for hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 73(3): 369–374. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03827.x>>.
27. Herring N, Szmigielski C, Becher H et al. Valvular heart disease and the use of cabergoline for the treatment of prolactinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 70(1): 104–108. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03458.x>>.

28. Vallette S, Serri K, Rivera J et al. Long-term cabergoline therapy is not associated with valvular heart disease in patients with prolactinomas. *Pituitary* 2009; 12(3): 153–157. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11102-008-0134-2>>.
29. Devin JK, Lakhani VT, Byrd BF et al. Prevalence of valvular heart disease in a cohort of patients taking cabergoline for management of hyperprolactinemia. *Endocr Pract* 2008; 14(6): 672–677.
30. Bogazzi F, Buralli S, Manetti L et al. Treatment with low doses of cabergoline is not associated with increased prevalence of cardiac valve regurgitation in patients with hyperprolactinaemia. *Int J Clin Pract* 2008; 62(12): 1864–1869. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-1241.2008.01779.x>>.
31. Kars M, Delgado V, Holman ER et al. Aortic valve calcification and mild tricuspid regurgitation but no clinical heart disease after 8 years of dopamine agonist therapy for prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(9): 3348–3356. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-2658>>.
32. Lancellotti P, Livadariu E, Markov M et al. Cabergoline and the risk of valvular lesions in endocrine disease. *Eur J Endocrinol* 2008; 159(1): 1–5. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-08-0213>>.
33. Wakil A, Rigby AS, Clark AL et al. Low dose cabergoline for hyperprolactinaemia is not associated with clinically significant valvular heart disease. *Eur J Endocrinol* 2008; 159(4): R11–R14. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-08-0365>>.
34. Lafeber M, Stades AM, Valk GD et al. Absence of major fibrotic adverse events in hyperprolactinemic patients treated with cabergoline. *Eur J Endocrinol* 2010; 162(4): 667–675. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-09-0989>>.
35. Khare S, Lila AR, Patil R et al. Long-term cardiac (valvulopathy) safety of cabergoline in prolactinoma. *Indian J Endocrinol Metab* 2017; 21(1): 154–159. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4103/2230-8210.196010>>.
36. Caputo C, Prior D, Inder WJ. The need for annual echocardiography to detect cabergoline-associated valvulopathy in patients with prolactinoma: a systematic review and additional clinical data. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3(11): 906–913. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70212-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70212-8)>. Erratum in *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3(11): e10.
37. De Vecchis R, Esposito C, Ariano C. Cabergoline use and risk of fibrosis and insufficiency of cardiac valves. Meta-analysis of observational studies. *Herz* 2013; 38(8): 868–880. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00059-013-3816-0>>.
38. Delgado V, Biermasz NR, van Thiel SW et al. Changes in heart valve structure and function in patients treated with dopamine agonists for prolactinomas, a 2-year follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77(1): 99–105. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/1/j.1365-2265.2011.04326.x>>.
39. Auriemma RS, Pivonello R, Perone Y et al. Safety of long-term treatment with cabergoline on cardiac valve disease in patients with prolactinomas. *Eur J Endocrinol* 2013; 169(3): 359–366. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-13-0231>>.
40. Drake WM, Stiles CE, Bevan JS et al. A Follow-Up Study of the Prevalence of Valvular Heart Abnormalities in Hyperprolactinemic Patients Treated With Cabergoline. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(11): 4189–4194.
41. Vroonen L, Lancellotti P, García MT et al. Prospective, long-term study of the effect of cabergoline on valvular status in patients with prolactinoma and idiopathic hyperprolactinemia. *Endocrine* 2017; 55(1): 239–245. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12020-016-1120-5>>.
42. Sandret L, Maison P, Chanson P. Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(5): 1327–1335. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2010-2443>>.
43. Pivonello R, De Martino MC, Cappabianca P 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(1): 223–230. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2008-1533>>.
44. Greenman Y, Cooper O, Yaish I et al. Treatment of clinically non-functioning pituitary adenomas with dopamine agonists. *Eur J Endocrinol* 2016; 175(1): 63–72. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-16-0206>>.
45. Samson SL, Ezzat S. AACE/ACE Disease State Clinical Review: Dopamine Agonists for Hyperprolactinemia and the Risk of Cardiac Valve Disease. *Endocr Pract* 2014; 20(6): 608–616. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4158/EP14148.RA>>.

MUDr. Filip Gabalec, Ph.D.

✉ filip.gabalec@fnhk.cz

IV. interní hematologická klinika LF UK a FN Hradec Králové
www.fnhk.cz

Doručeno do redakce 28. 7. 2017

Přijato po recenzi

Dopamine 2 and Somatostatin 1-5 Receptors Coexpression in Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas

F. GABALEC¹, M. DRASTIKOVA², T. CESAK³, D. NETUKA⁴, V. MASOPUST⁴, J. MACHAC⁵, J. MAREK⁶, J. CAP¹, M. BERANEK²

¹Fourth Department of Internal Medicine – Hematology, ²Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, ³Department of Neurosurgery, University Hospital Hradec Kralove and Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic, ⁴Department of Neurosurgery, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Central Military Hospital Prague, Czech Republic, ⁵Department of Neurosurgery, University Hospital, Olomouc, Czech Republic, ⁶Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

Received May 2, 2014

Accepted October 8, 2014

On-line December 22, 2014

Summary

This study investigated quantitated expression of dopamine 2 receptor (D2R) and somatostatin receptors of the five types (SSTR1-SSTR5) in a large series of clinically non-functioning pituitary adenomas (CNFAs). Co-expression of these receptors in individual adenomas was studied as well as correlation between receptor types. Adenoma tissue from 198 patients who underwent surgery for CNFAs was analyzed by immunohistochemistry and quantitative real-time PCR. *D2R* and *SSTR1-3* mRNA was expressed in all 198 adenomas. *SSTR4* and *SSTR5* were detectable in 85 % and 61 % of adenomas, respectively. Expression of D2R was significantly higher than that of the somatostatin receptors. The median relative expressions were as follows from highest D2R >> SSTR3 > SSTR2 > SSTR1 > SSTR5 > SSTR4. High relative expression (ratio to β -glucuronidase mRNA > 1) of D2R was found in 60 % of tumors, high expression of SSTR1 in 7.5 %, SSTR2 in 7 %, SSTR3 in 4 % and SSTR5 in 0.5 %. The quantity of D2R correlated positively with expression of SSTR2 and SSTR3, and negatively with SSTR1 and SSTR5. Among histological adenoma types, *SSTR1* was significantly higher in null-cell adenomas and *SSTR3* was lower in silent corticotroph adenomas. In conclusions, in CNFAs, high expression of somatostatin receptors is much less common than that of D2R, and co-expression of both these receptors is exceptional. D2R and SSTR3 seem to be the most promising targets for pharmacological treatment.

Key words

Dopamine receptor • Somatostatin receptor • Estrogen receptor • Clinically non-functioning adenomas • Pituitary adenomas • Immunohistochemistry • Real-time PCR

Corresponding author

M. Beranek, Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic. E-mail: beranek@lfhk.cuni.cz

Introduction

Clinically non-functioning pituitary adenomas (CNFAs) represent one third of human pituitary tumors. An estimated prevalence of all pituitary tumors is 16.7 % (Ezzat *et al.* 2004). Diagnosis of CNFAs is often determined when the tumor had grown to the stage of macroadenoma and presents with signs of mass effect. The majority of CNFAs produce either low, non-significant amounts of hormones or defective hormones. No more than 10 % of CNFAs are immunohistochemically negative; these are called null-cell adenomas (Jaffe 2006). Transsphenoidal surgery is the primary option for CNFAs requiring treatment. However, because of frequent supra- or parasellar extension, surgery is infrequently curative, leaving tumor

remnants that regrow in 12-58 % of patients within 5 years of follow-up (Greenman *et al.* 2003, Brochier *et al.* 2010). The only independent predictors for tumor regrowth are: a) preoperative presence of cavernous sinus invasion, and b) postoperative suprasellar extent of residual tumor (Greenman *et al.* 2003). In postoperative management of patients, there is no clear strategy. We can choose between reoperation, Leksell-gamma knife surgery or pharmacological treatment. Each option has its drawbacks. The presence of somatostatin (SSTR) and dopamine 2 subtype (D2R) receptors in CNFAs has been proved by several methods including radioligands, *in situ* hybridization, RT-PCR, and quantitative real-time RT-PCR. However, empirical use of dopamine agonists (DA) or somatostatin analogues (SA) alone or in combination has been effective in only a few cases (Colao *et al.* 2008). Recently, new chimeric compounds “dopastatins” showed promising efficacy *in vitro* (Florio *et al.* 2008). In contrast, pharmacological treatment of CNFAs has not been successful. Highly variable expression or homo/heterodimerization of receptors in the pituitary gland partly could explain this discrepancy (Renner *et al.* 1998, Taboada *et al.* 2007, Neto *et al.* 2009). Thus, knowledge of receptor mRNA expression patterns would help in the targeted therapy (Babu *et al.* 2014). The aim of this study was to quantify coexpression of SSTR1-5 and D2R in a large series of CNFAs and to correlate the results with the pathological classification of adenomas.

Patients and Methods

Clinically non-functioning adenomas were diagnosed based on the absence of hypersecretory laboratory markers. Specifically, the IGF-I level was normal or low for the particular age, and the serum prolactin level was normal or only slightly elevated to a level considered appropriate to stalk compression seen on MRI. Urinary free cortisol was not elevated. Serum free thyroid hormones were normal or lower. Luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone, free testosterone (or estradiol in women) were evaluated. Diagnosis of adenoma was confirmed by pathological investigation after surgery. We enrolled 198 patients who fulfilled study criteria. Several patients from our previous analysis of D2R expression (Gabalec *et al.* 2012) from whom we had cDNA stored for further analysis were also included. The study was approved by the Ethics Committee; patients had all signed informed consent

forms. Subjects were 113 men and 85 women, aged 15-87 years (mean \pm standard deviation 60.4 \pm 13.1). All tumors except of one were macroadenomas; sized (at their largest diameters) 7-53 mm (mean \pm standard deviation 25.9 \pm 8.8 mm; median: 25 mm). The most common indications for operation were bitemporal hemianopsia or visual defect in 89 cases (45 %), diplopia due to nerve palsy in 26 cases (13 %), progression of tumor growth on MRI in 18 (9 %) and headache in 21 (11 %), or in 44 (22 %) in combination. Most patients underwent surgery by transsphenoidal endoscopic approach. Three patients needed subfrontal surgery due to the adenoma extent. At initial evaluation, hypopituitarism was present in 50 patients, diabetes insipidus in 4 cases, 26 patients had hypogonadism and only 2 subjects with hypogonadism had substitution prior to diagnosis.

Pathology

Tissue specimens were investigated as described in our previous work (Cap *et al.* 2003, Gabalec *et al.* 2012). Briefly, adenoma tissue specimens obtained at surgery were immediately fixed in 10 % formalin, routinely processed, and subsequently embedded in paraffin. Sections 5 μ m thick were stained with hematoxylin-eosin and Goldberg's trichrome. The Gömöri silver impregnation of reticuline was used to enhance staining of fibrous tissue. In total, 133 specimens from 75 men and 58 women, aged 23-87 years (61.4 \pm 12.2 years) underwent immunohistochemical analysis. For immunohistochemistry (IHC), serial sections from the same paraffin blocks were usually exposed to a heat-mediated antigen retrieval procedure in citrate buffer, pH 6.0, using a microwave oven. We investigated the following pituitary hormones: ACTH (monoclonal mouse antibodies, Dako, Denmark); GH; prolactin; and specific β -subunits of the dimeric glycoproteins TSH, FSH, LH, and their common α -subunit (monoclonal antibodies, Immunotech, Prague, Czech Republic). We used the avidin-biotin technique and diaminobenzidine staining. Expression of each hormone was described semiquantitatively in 4 stages: 0: absolutely negative; 1: slight positivity in <15 % of cells; 2: positivity in 15-70 % of cells; and 3: strong positivity in >70 % of cells.

Quantitative real-time RT-PCR

Details of RNA extraction, reverse transcription and quantification were described previously (Gabalec *et al.* 2012). Briefly, for RT-PCR analysis, small tissue

samples were immediately stored in RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and frozen at -80°C for RNA stabilization. RNA was isolated by Trizol Reagent (Invitrogen, USA) following manufacturer's instructions and transcribed to cDNA by SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, USA). We made a real-time PCR master mix of 5 μl of cDNA, 12.5 μl TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies, USA), 300 nM of each primer and 200 nM of hydrolytic fluorescent probe. The probe and primers for D2R, SSTR1, 2, 3 and 5 were published previously (O'Toole *et al.* 2006). SSTR4 analyses were performed using Taqman Gene Expression Assays Hs01566620_s1 (Life Technologies, USA). After incubation for 2 min at 50°C and 10 min denaturation at 95°C , we performed 50 PCR cycles of 15 s denaturation at 95°C and 60 s annealing and elongation at 60°C , on a Rotor-Gene 6000 (Corbett, Australia). Serial diluted plasmids pCR4 (Invitrogen, USA) with SSTR1-5 inserts (Generi Biotech, Czech Republic) were used for calibration. Taking into account RNA degradation processes, mRNA quantities were normalized to that of β -glucuronidase (GUS) housekeeping gene (Qiagen, Germany).

Statistics

mRNA quantities were expressed both absolutely, in copies per 5 μl of cDNA, and relatively as the ratio of the receptor subtype to housekeeping gene copies. The distribution of values in the whole sample and by groups according to the immunocytochemical classification proved to be non-Gaussian using Kolmogorov-Smirnov test (with Lilliefors' correction). For this reason, the groups were characterized by median and percentiles and the Mann-Whitney rank sum test was used to evaluate differences between individual groups. Comparisons were also done with the use of Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks (Dunn's method). Correlation between various receptors expression was evaluated using Spearman Rank Order Correlation. $P < 0.05$ was considered significant. SigmaStat version 3.5 software (Systat Software, San Jose, USA) was used.

Results

qRT-PCR analysis

D2R and SSTR1-3 mRNA was expressed in all 198 adenomas examined. SSTR4 and SSTR5 were detectable in 85 % and 61 % of adenomas, respectively.

Absolute median values of mRNA expression were 1380 copies/ μl for SSTR1 (range: 24-1144017), 4701 copies/ μl for SSTR2 (5-577816), 5911 copies/ μl for SSTR3 (1-112093), 2 copies/ μl for SSTR4 (0-2660), 14 copies/ μl for SSTR5 (0-59631) and 222075 copies/ μl for D2R (1-2580406). After normalization to the GUS housekeeping gene the median of relative mRNA expression was 2.34 for SSTR1, 8.26 for SSTR2, 11.38 for SSTR3, 0.01 for SSTR4, 0.02 for SSTR5 and 212.20 for D2R. Expression of D2R was significantly higher than that of the somatostatin receptors. Median relative expressions were as follows from highest D2R \gg SSTR3 $>$ SSTR2 $>$ SSTR1 $>$ SSTR5 $>$ SSTR4 (Fig. 1).

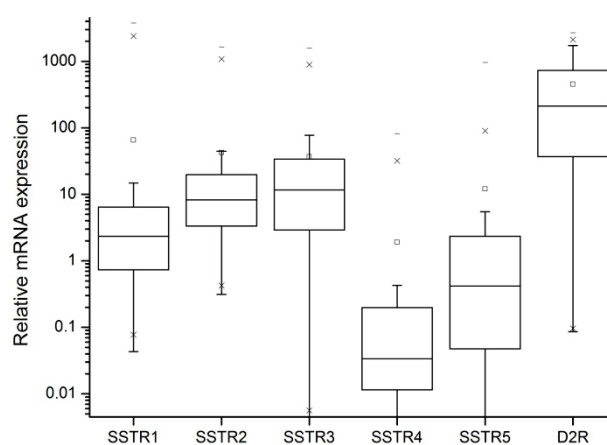


Fig. 1. Relative expression of SSTR1-5 and D2R normalized to GUS in CNFAs. Upper border of the box: 75th percentile; lower border: 25th percentile; line: median; whiskers: 99th percentile range; small square: arithmetic mean; crosses: extreme values.

Expression of D2R correlated positively (Correlation Coefficient 0.199, $P < 0.01$) with adenoma size. No correlation with size was found for other receptors. Receptor expression was not influenced by tumor extension.

Expression of D2R correlated positively with expression of SSTR2 and SSTR3 and inversely with expression of SSTR1 and SSTR5 (Fig. 2, Table 1). D2R expression was high (relative expression > 1) in most CNFAs, whereas expression of individual somatostatin receptor types was much lower, high expression being an exception (Fig. 3).

High expression of somatostatin receptors was rare (15/198 for SSTR1, 14/198 for SSTR2, 8/198 for SSTR3 and 1/198 for SSTR5, respectively; Table 2). Coexpression of both SSTR and D2R in high quantities was even less frequent.

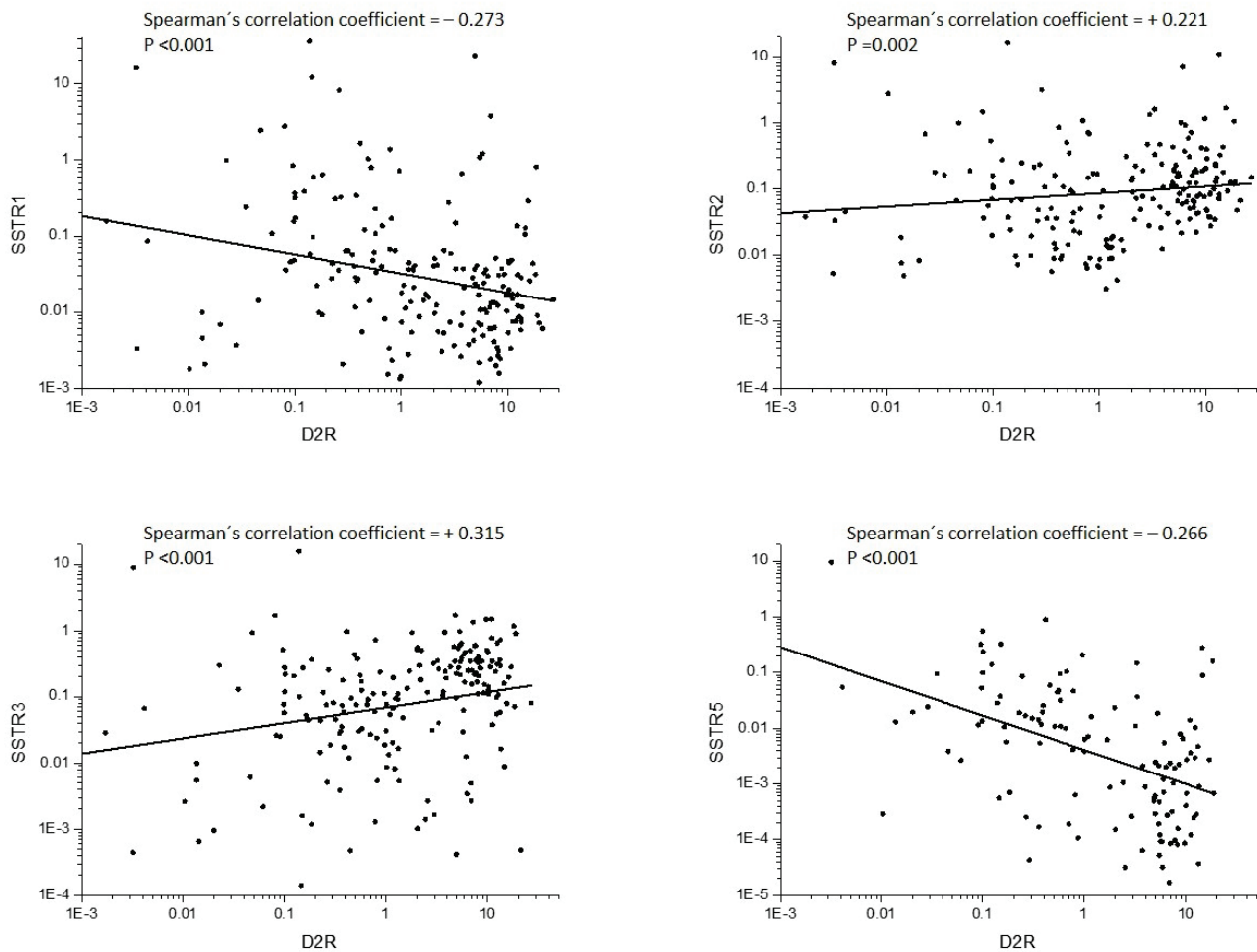


Fig. 2. Correlations of dopamine receptor (D2R) and four somatostatin receptor types relative expression. Statistical significance was established by Spearman Rank Order Correlation.

Table 1. Correlation coefficients and their significance by Spearman Rank Order Correlation.

	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	D2R
<i>SSTR1</i>	0.384 p<0.001	0.0393 p=0.583	0.394 (p<0.001)	0.304 (p<0.001)	-0.273 (p<0.001)
<i>SSTR2</i>		0.335 (p<0.001)	0.0283 p=0.755	0.0245 p=0.732	0.221 p=0.002
<i>SSTR3</i>			0.026 p=0.775	-0.0159 p=0.825	0.315 (p<0.001)
<i>SSTR4</i>				0.289 p=0.001	-0.0726 p=0.424
<i>SSTR5</i>					-0.266 (p<0.001)

qRT-PCR analysis of adenomas according to immunohistochemistry

Among 133 immunohistochemically analyzed specimens, we saw 9 (6.8 %) null-cell adenomas,

103 (77.4 %) gonadotrophs, 11 (8.3 %) silent corticotroph tumors and 10 (7.5 %) plurihormonal tumors. Receptors mRNA median relative expression for different subtypes is shown in Table 3.

The median of relative mRNA expression showed the same pattern as the complete group. In contrast, SSTR3 and D2R expressions were significantly lower in silent ACTH adenomas (Kruskal-Wallis analysis on ranks, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). SSTR1 was

expressed significantly more in null cell adenomas than in gonadotrophs (Kruskal-Wallis analysis on ranks, $P < 0.021$). Expression of SSTR1 was also higher in null cell adenomas than other subtypes, but this was not statistically significant (Fig. 4).

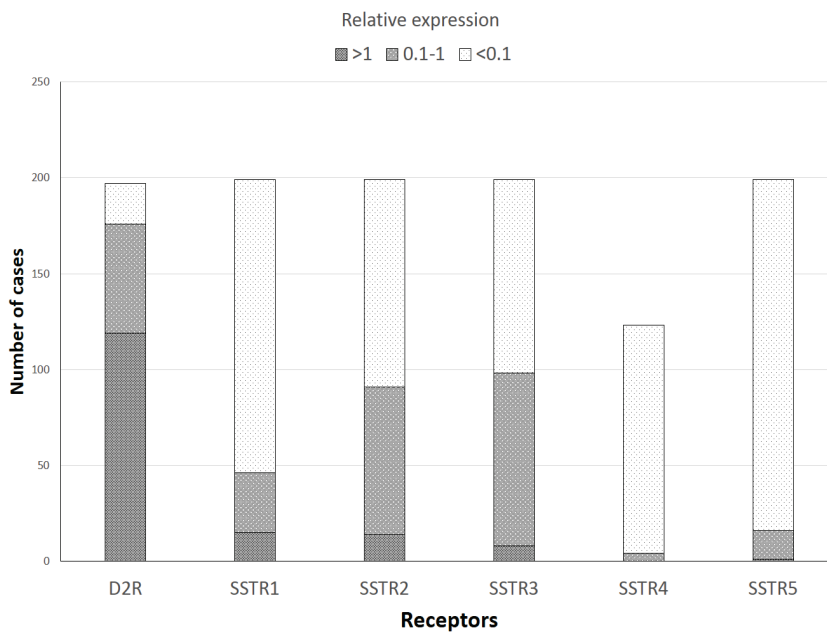


Fig. 3. Number of adenomas with high (>1), medium (0.1-1) and low (<0.1) relative expression of individual receptors, normalized to percentage of GUS.

Table 2. Number of patients with high somatostatin receptors (relative mRNA expression/GUS > 1), relative to D2R expression (n=198 adenomas).

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR5
<i>D2R/GUS > 1</i>	4	8	5	0
<i>D2R/GUS < 1</i>	11	6	3	1
<i>Total</i>	15	14	8	1

Table 3. Median *SSTR1-5* and *D2R* mRNA expression (relative to GUS) for different adenoma subtypes.

	Median relative mRNA expression/GUS					
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	D2R
<i>Null cell adenomas</i>	34.00	12.20	0.50	0.01	0.00	134.03
<i>Gonadotrophs</i>	2.18	6.55	11.09	0.00	0.02	109.10
<i>Silent ACTH</i>	2.77	4.53	0.99	0.00	1.90	2.01
<i>Plurihormonal</i>	4.35	3.81	24.06	0.00	0.00	13.70

Discussion

Transsphenoidal surgery is a standard approach to treating CNFAs. However, management of postoperative residual tumor is controversial. Dopamine

agonists are a possible treatment option, as CNFAs express dopamine receptors. Greenman *et al.* (2005) treated 33 patients with residual tumor after surgery. Tumor remnants volumes decreased in 11 cases after DA treatment, but D2R expression was not determined.

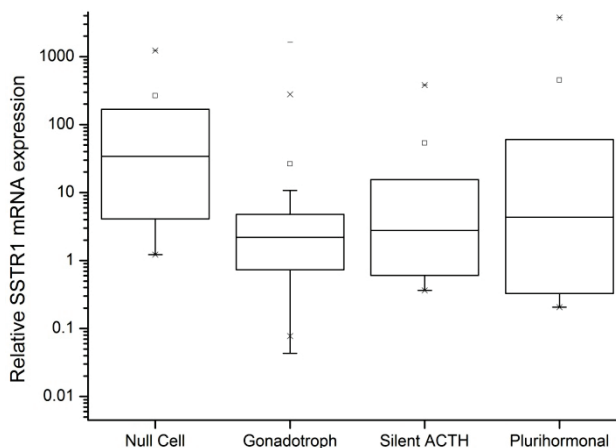


Fig. 4. Relative expression of SSTR1R normalized to GUS in individual CNFA pathology types. Null-cell adenomas and gonadotrophs differed significantly (* P=0.021).

Pivonello *et al.* (2004) proved that tumor shrinkage after DA treatment correlates with D2R expression. Results of treatment with DA in CNFAs were reviewed by Colao *et al.* (2008). Cumulative evidence for tumor shrinkage in CNFAs after treatment with DA was 27.6%. This is in agreement with the finding that about 20–25% CNFAs express D2R in relatively high quantities (Su *et al.* 2012). High variability in dopamine 2 receptor expression (in agreement with other studies (Neto *et al.* 2009) also concurs with our work (Gabalec *et al.* 2012).

SSTR1, SSTR2, SSTR3 and SSTR5 are expressed in pituitary adenomas and in normal pituitary tissue. In comparison, SSTR4 expression is low or missing (Taboada *et al.* 2007, Neto *et al.* 2009). The effect of somatostatin and its analogues is determined by the binding receptor. Each receptor starts different signal pathways and intracellular response (Hofland *et al.* 2003, Zatelli *et al.* 2004, Ferone *et al.* 2009). Treatment with somatostatin analogues in CNFAs has poor results. Data with short-acting octreotide showed tumor volume reduction only in 12%, whereas most tumors remained stable (Colao *et al.* 2008). A study with octreotide LAR in CNFAs *in vivo* showed stable tumor remnants in the majority of cases and tumor volume enlargement in 19% of cases (Fusco *et al.* 2012). Conversely, *in vitro* studies with somatostatin and lanreotide showed significantly inhibited cell proliferation in CNFAs (Florio *et al.* 1999). In another study SA binding SSTR1, SSTR2 and/or SSTR5 inhibited cell viability and alpha-subunit secretion *in vitro* (Zatelli *et al.* 2004). In CNFAs, our work supports the findings of Taboada *et al.* (2007) that SSTR3 has the highest expression levels followed by SSTR2.

Other authors report predominant and highly variable expression of SSTR2 and SSTR3 (Saveanu *et al.* 2001, 2009, Florio *et al.* 2008, Tateno *et al.* 2009, Babu *et al.* 2014), but SSTR5 was not reported in these papers or had low expression. We observed SSTR5 expression in 61% of cases and SSTR1 expression in all cases, which is more than was reported by Taboada *et al.* (2007). However, Babu *et al.* (2004) reported SSTR5 expression in 82% of patients. High variability of expression together with preferential binding of current analogues to SSTR2 could explain the low efficacy of SA. To date, no studies that use qRT-PCR correlate the number of receptor copies in CNFAs with response to SA.

Coexpression of dopamine and somatostatin receptors was evaluated only in few studies. Coexpression of SSTR2, SSTR3 and D2R in most evaluated CNFAs had highly variable expression levels (Florio *et al.* 2008, Neto *et al.* 2009, Saveanu *et al.* 2009, Nishioka *et al.* 2011). In all series somatostatin receptors are expressed much less than D2 receptors (Florio *et al.* 2008, Neto *et al.* 2009, Saveanu *et al.* 2009). In our study D2R expression was also higher by one order than SSTR3 or SSTR2 expression. Similar data were reported by Saveanu *et al.* (2009) for 58 CNFAs. The same patterns of D2R and SSTR expression were also seen in CNFAs cell cultures (Florio *et al.* 2008). High numbers of copies in both somatostatin and dopamine receptors were seen in 3 of 17 patients in the study of Babu *et al.* (2014). Evidence indicates that D2R and SSTR can form heterodimers that influence their binding capacity, signalization and internalization. After heterodimerization of SSTR5 with D2R or SSTR2 with D2R, new receptors presented with new conformation, higher activities and binding capacities for both SA and DA (Rocheville *et al.* 2000, Baragli *et al.* 2007). Adenomas with high expression of somatostatin receptors are rare and those with high coexpression of both somatostatin and dopamine receptors are an exception. Therefore chimeric compound BIM-23A760 that bind both somatostatin and dopamine receptors did not inhibit cell cultures more than DA alone (Gruszka *et al.* 2006, Florio *et al.* 2008).

We found negative correlation between D2R expression and expression of SSTR1 and SSTR5, but D2R expression correlated positively with expression of SSTR2 and SSTR3. This is an original finding, different from that of Neto *et al.* (2009) who found no correlation in 14 CNFAs. The number of samples probably explains the discrepancy, as the relationship is not very close. Some adenomas had low D2R expression and high

somatostatin receptor expression, especially of the 1 and 5 subtypes.

With regard to pathological subtypes of CNFAs, we found significantly lower expression of SSTR3 in silent corticotrophs. The median relative SSTR5 expression was higher than in other subtypes, but this difference was not significant. Higher SSTR5 expression was previously reported in corticotroph adenomas (de Bruin *et al.* 2009). Tateno *et al.* (2009) also reported high SSTR5 expression in corticotroph adenoma, but did not observe significant differences between silent corticotrophs and other CNFAs. SSTR5 expression was even lower than in CNFAs. Again, this discrepancy might be due to the number of examined adenomas.

To our knowledge no previous study has correlated D2R and SSTR coexpression to pathological subtype. Compared with gonadotroph and null-cell adenomas, where D2R expression was predominant and significantly higher than SSTR, SSTR3 and SSTR2 were

the most expressed receptors (although not significantly) in plurihormonal adenomas and silent corticotrophs, respectively. SSTR1 was statistically more expressed in null-cell adenomas than in other subtypes. Evaluation of other subtypes is limited by small number of cases other than gonadotrophs.

To conclude, in CNFAs, high expression of somatostatin receptors is much less common than that of D2R, and coexpression of both these receptors is exceptional.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the grant SVV 260057/2014, GAUK 723912 and by the project PRVOUK P37 of the Charles University in Prague, Czech Republic.

References

- BABU A, LUQUE RM, GLICK R, UTSET M, FOGELFELD L: Variability in quantitative expression of receptors in nonfunctioning pituitary macroadenomas - an opportunity for targeted medical therapy. *Endocr Pract* **20**: 15-25, 2014.
- BARAGLI A, ALTURAIHI H, WATT HL, ABDALLAH A, KUMAR U: Heterooligomerization of human dopamine receptor 2 and somatostatin receptor 2 Co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer analysis. *Cell Signal* **19**: 2304-2316, 2007.
- BROCHIER S, GALLAND F, KUJAS M, PARKER F, GAILLARD S, RAFTOPOULOS C, YOUNG J, ALEXOPOULOU O, MAITER D, CHANSON P: Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients. *Eur J Endocrinol* **163**: 193-200, 2010.
- CAP J, CERMAN J, NEMECEK S, MAREKOVA M, HANA V, FRYSAK Z: The influence of treatment with somatostatin analogues on morphology, proliferative and apoptotic activity in GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Neurosci* **10**: 444-448, 2003.
- COLAO A, DI SOMMA C, PIVONELLO R, FAGGIANO A, LOMBARDI G, SAVASTANO S: Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* **15**: 905-915, 2008.
- DE BRUIN C, PEREIRA AM, FEELDERS RA, ROMIJN JA, ROELFSEMA F, SPRIJ-MOOIJ DM, VAN AKEN MO, VAN DER LELIJ AJ, DE HERDER WW, LAMBERTS SW, HOFLAND LJ: Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 1118-1124, 2009.
- EZZAT S, ASA SL, COULDWELL WT, BARR CE, DODGE WE, VANCE ML, MCCUTCHEON IE: The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* **101**: 613-619, 2004.
- FERONE D, GATTO F, ARVIGO M, RESMINI E, BOSCHETTI M, TETI C, ESPOSITO D, MINUTO F: The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol* **42**: 361-370, 2009.
- FLORIO T, THELLUNG S, ARENA S, CORSARO A, SPAZIANTE R, GUSSONI G, ACUTO G, GIUSTI M, GIORDANO G, SCHETTINI G: Somatostatin and its analog lanreotide inhibit the proliferation of dispersed human non-functioning pituitary adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol* **141**: 396-408, 1999.

- FLORIO T, BARBIERI F, SPAZIANTE R, ZONA G, HOFLAND LJ, VAN KOETSVELD PM, FEELDERS RA, STALLA GK, THEODOROPOULOU M, CULLER MD, DONG J, TAYLOR JE, MOREAU JP, SAVEANU A, GUNZ G, DUFOUR H, JAQUET P: Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocr Relat Cancer* **15**: 583-596, 2008.
- FUSCO A, GIAMPIETRO A, BIANCHI A, CIMINO V, LUGLI F, PIACENTINI S, LORUSSO M, TOFANI A, PEROTTI G, LAURIOLA L, ANILE C, MAIRA G, PONTECORVI A, DE MARINIS L: Treatment with octreotide LAR in clinically non-functioning pituitary adenoma: results from a case-control study. *Pituitary* **15**: 571-578, 2012.
- GABALEC F, BERANEK M, NETUKA D, MASOPUST V, NAHLOVSKY J, CESAK T, MAREK J, CAP J: Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* **15**: 222-226, 2012.
- GREENMAN Y, OUAKNINE G, VESHCHEV I, REIDER G II, SEGEV Y, STERN N: Postoperative surveillance of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: markers of tumour quiescence and regrowth. *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**: 763-769, 2003.
- GREENMAN Y, TORDJMAN K, OSHER E, VESHCHEV I, SHENKERMANN G, REIDER G II, SEGEV Y, OUAKNINE G, STERN N: Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* **63**: 39-44, 2005.
- GRUSZKA A, KUNERT-RADEK J, RADEK A, PISAREK H, TAYLOR J, DONG JZ, CULLER MD, PAWLIKOWSKI M: The effect of selective sst1, sst2, sst5 somatostatin receptors agonists, a somatostatin/dopamine (SST/DA) chimera and bromocriptine on the "clinically non-functioning" pituitary adenomas in vitro. *Life Sci* **78**: 689-693, 2006.
- HOFLAND LJ, LAMBERTS SW: The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev* **24**: 28-47, 2003.
- JAFFE CA: Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary* **9**: 317-321, 2006.
- NETO LV, MACHADO EDE O, LUQUE RM, TABOADA GF, MARCONDES JB, CHIMELLI LM, QUINTELLA LP, NIEMEYER P JR, DE CARVALHO DP, KINEMAN RD, GADELHA MR: Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 1931-1937, 2009.
- NISHIOKA H, TAMURA K, IIDA H, KUTSUKAKE M, ENDO A, IKEDA Y, HARAOKA J: Co-expression of somatostatin receptor subtypes and estrogen receptor-alpha mRNAs by non-functioning pituitary adenomas in young patients. *Mol Cell Endocrinol* **331**: 73-78, 2011.
- O'TOOLE D, SAVEANU A, COUVELARD A, GUNZ G, ENJALBERT A, JAQUET P, RUSZNIEWSKI P, BARLIER A: The analysis of quantitative expression of somatostatin and dopamine receptors in gastro-entero-pancreatic tumours opens new therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol* **155**: 849-857, 2006.
- PIVONELLO R, MATRONE C, FILIPPELLA M, CAVALLO LM, DI SOMMA C, CAPPABIANCA P, COLAO A, ANNUNZIATO L, LOMBARDI G: Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 1674-1683, 2004.
- RENNER U, ARZBERGER T, PAGOTTO U, LEIMGRUBER S, UHL E, MULLER A, LANGE M, WEINDL A, STALLA GK: Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1368-1375, 1998.
- ROCHEVILLE M, LANGE DC, KUMAR U, PATEL SC, PATEL RC, PATEL YC: Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**: 154-157, 2000.
- SAVEANU A, GUNZ G, DUFOUR H, CARON P, FINA F, OUAFIK L, CULLER MD, MOREAU JP, ENJALBERT A, JAQUET P: Bim-23244, a somatostatin receptor subtype 2- and 5-selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 140-145, 2001.

-
- SAVEANU A, JAQUET P: Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas. *Rev Endocr Metab Disord* **10**: 83-90, 2009.
- SU Z, WANG C, WU J, JIANG X, CHEN Y, CHEN Y, ZHENG W, ZHUGE Q, WU Z, ZENG Y: Expression of dopamine 2 receptor subtype mRNA in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurol Sci* **33**: 275-279, 2012.
- TABOADA GF, LUQUE RM, BASTOS W, GUIMARAES RF, MARCONDES JB, CHIMELLI LM, FONTES R, MATA PJ, FILHO PN, CARVALHO DP, KINEMAN RD, GADELHA MR: Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* **156**: 65-74, 2007.
- TATENO T, KATO M, TANI Y, OYAMA K, YAMADA S, HIRATA Y: Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas. *Endocr J* **56**: 579-584, 2009.
- ZATELLI MC, PICCIN D, BOTTONI A, AMBROSIO MR, MARGUTTI A, PADOVANI R, SCANARINI M, TAYLOR JE, CULLER MD, CAVAZZINI L, DEGLI UBERTI EC: Evidence for differential effects of selective somatostatin receptor subtype agonists on alpha-subunit and chromogranin a secretion and on cell viability in human nonfunctioning pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 5181-5188, 2004.
-

3.4 Radioterapie

Radioterapie je jednou z možností, jak zajistit nemocného po operaci, zůstává-li residuum. Zevní radioterapie v původním slova smyslu dokáže ve většině případů kontrolovat onemocnění, ale je spojena s významnými nežádoucími účinky, proto její popularita byla v minulosti malá. Moderní techniky zahrnující stereotaktickou radiochirurgii nebo frakcionované stereotaktické ozáření jsou dnes preferované metody. Patří mezi ně např. Leksellův gama nůž, Cyberknife nebo stereotaktický lineární urychlovač. Nejnovější metodou je protonové ozáření, které vykazuje výsledky jako konvenční ozáření nebo stereotaktická radiochirurgie.

Konvenční radioterapie byla používána hlavně k ošetření velkých residuí nebo progredujících KAA. Používány byly dávky od 45 do 55 Gy v 1,8-2 Gy na frakci. Kontroly růstu bylo dosaženo v 80-90 % po 10 a v 75-90 % po 20 letech.¹⁰⁹ Nejčastější komplikací je hypopituitarismus. Objevuje se u 20-30 % nemocných a jeho riziko stoupá v čase. Současně je riziko neuropatie optiku. Obávaný je vznik sekundárních tumorů CNS. Větší riziko je u mladých a jsou práce, které ukazují na stejné riziko při použití Leksellova gama nože stejně jako u frakcionovaného ozáření.¹¹⁰ V přehledovém článku se objevují s latencí v průměru 15 let a při průměrných dávkách $52,0 \pm 19,5$ Gy.¹¹¹

Stereotaktická radiochirurgie dosahuje kontroly růstu residua/adenomu v 90-95% v 5 letech. Data z dostupných studií byla nedávno shrnuta a Leksellův gama nůž je nejčastěji používanou metodou.¹⁰⁹ U 20-60 % nemocných bylo patrné zmenšení tumoru. Výhodou je méně závažných nežádoucích účinků. Mezi nejčastější, i při použití Leksellova gama nože, patří hypopituitarismus. Jeho incidence byla v 5 letech 10-40 %. Na pražském pracovišti v prvních letech provozu byla incidence hypopituitarismu 38 %.¹¹² Později na stejném místě potvrdili, že vznik hypopituitarismu je závislý na dávce, kterou zasáhneme okolní tkáň. Doporučená bezpečná a zároveň účinná dávka je do 15 Gy. V souboru nemocných došlo po 5letém sledování při ozáření dávkou okolní tkáňe do 15 Gy ke vzniku hypopituitarismu pouze v 2,2 %, u dávky větší než 15 Gy pak v 55 %.¹¹³ V literatuře je zmíněna dávka záření 12–20 Gy, s optimem mezi 14–18 Gy.¹¹⁴ Nejcitlivější k ozáření se jeví osa růstového hormonu, za ní následuje osa gonadální, adrenokortikální a TSH. Doživotní endokrinologické sledování je nezbytné. V klinické praxi malá residua můžeme ponechat bez ozáření a za pomoci MR sledovat, naopak u tumorů chovajících se agresivně a při velkém residuu je možnost radiační techniku využít.

3.5 Faktory pro předpověď rekurence klinicky afunkčních adenomů

I přes současné pokroky neurochirurgický zákrok často nevede k úplnému odstranění makroadenomů hypofýzy a někdy zůstává residuum. K recidivě růstu nádoru dochází v případě úplného odstranění tumoru až v 24 % a ve 14—73 % v případě ponechaného residua.¹¹⁵ Po pěti letech dochází k růstu u 15-66 % nemocných v případě samotné operace a u 2-28 % nemocných je-li operace doplněna adjuvantním ozářením. V případě růstu připadá v úvahu reoperace, ozáření nebo kontroverzní farmakologická léčba. Ale i takto zaléčené tumory mohou opět růst. Riziko dalšího růstu v 5 a 10 letech je 35 respektive 47 %.¹¹⁶ S ohledem na riziko růstu musí být nemocní doživotně sledováni. Studie, které hledaly faktory předpovídající růst/rekurenci u KAA byly často retrospektivní, na malých souborech nemocných, s různou délkou a metodikou sledování. Kritéria pro recidivu byla různorodá, často bylo nemožné odlišit progresi postoperačního residua a opravdovou recidivu – tedy nový růst tumoru po kompletní resekci. Poslední metaanalýzy hovoří o častějších recidivách u KAA než u ostatních adenomů s hypersekrecí.^{117, 118} Jednoznačná data o optimálním přístupu nemáme.

3.5.1 Klinické faktory

Nejlepším prediktorem rekurence je postoperační residuum. V případě zdánlivě kompletní resekce je riziko rekurence za 10 let 0-6 %. V případě ponechaného intraselárního residua 42-53 %. V případě residua extraselárně dosahuje rekurence až 77-80 %.¹¹⁹⁻¹²¹ Signifikantně horší výsledky jsou především u nemocných s invazí do kavernózního sinu a velkých tumorů se supraselární expanzí. Ozáření pravděpodobnost rekurence snižuje na 2-28% v 5 letech od operace.¹²² Jak již bylo zmíněno i tyto tumory mohou dále růst. Patofyziologické mechanismy zodpovědné za agresivní chování KAA nebyly stále objasněny a validovaný prognostický biomarker neexistuje. Vliv neměl věk, pohlaví, velikost tumoru ani invazivita a/nebo histologický typ.¹²³

3.5.2 Histologické faktory

U tumorů s rekurencí bylo vyšší procento Ki-67 (proliferativní index) pozitivních buněk a vyšší TUNEL pozitivita (apoptotický index).¹²⁴ Indexy proliferace a apoptózy spolu ovšem většinou korelují. Jak bylo vidět v práci našich kolegů s akromegalickými adenomy, snižoval

somatostatin jak proliferaci, tak apoptózu.¹²⁵ Studií hodnotících index Ki-67 jako relevantní marker proliferace, kdy jeho čtenější výskyt byl spojen s aktivnějším růstem či vyšším procentem recidivy, je více. Jsou i práce s protichůdnými výsledky, kdy vyšší proliferační aktivita nebyla spojena s častějšími recidivami a rychlejším růstem. Ani na našem pracovišti neprokázal Česák a kol. závislost rychlosti růstu KAA a proliferačního indexu.¹²⁶ U rekurentních tumorů byla dále pozorována vyšší exprese markerů asociovaných s buněčnou proliferací – fosfoAkt a fosfoMAPK aktivační cesta, a naopak měly nižší expresi fosfoCREB (phospho cAMP response element binding) a ZAC1 (PLAGL1 – polyclonal pleiomorphic adenoma gene-like 1). Exprese pptg1 pozitivně korelovala s rekurencí.¹²⁴ Lepší porozumění expresním profilům těchto markerů by mohlo umožnit predikci rekurence tumorů. Nicméně nebyl nalezen ukazatel, který by v individuálním případě dokázal rozhodnout, kterého nemocného například ozářit.

V případě ACTH pozitivivity (tiché kortikotropní adenomy) jsou data kontroverzní. Některé studie poukazují na horší prognózu a častější rekurenci,¹²⁷ jiné ne.¹¹⁶

3.5.3 Proteomická analýza

Počet prací, které studují KAA pomocí proteomických technologií, je velmi omezený. Většina z nich využívá v dnešní době již neaktuální metodiky, u kterých byl prokázán nízký potenciál pro dostatečné pokrytí proteomu studovaných vzorků. V roce 2012 publikovanou proteomickou analýzou séra navrhl Hu et al. několik potencionálních markerů, nicméně vzhledem k použité technologii nebylo možné určit identitu jednotlivých proteinů.¹²⁸ Takto získané výsledky mají zpravidla velmi omezený potenciál pro další klinické testování takových markerů. Před ním porovnával Moreno a Zhan KAA oproti zdravé hypofýze, kdy byla zjištěna rozdílná exprese 50, resp. 56 proteinů.^{129, 130} Odběry od kadaverů však mají rovněž své limity.

4 Léčba akromegalie

4.1 Operace

Primárním přístupem je ve většině případů transsfenoidální neurochirurgický výkon. Úspěšná operace způsobuje okamžité snížení hladin GH.¹³¹ Dosažení remise po operaci je > 85 % pro mikroadenomy a 40-50 % pro makroadenomy, pokud operaci provádí zkušený chirurg. Pro Českou republiku máme k dispozici data z Neurochirurgické kliniky Ústřední vojenské nemocnice v Praze za roky 2009-2014. Endokrinologické remise (hodnocené dle konsensu z 2010 jako IGF-I v normě pro daný věk a pohlaví a náhodný GH < 1 ug/L nebo GH při oGTT < 0,4 ug/L) bylo dosaženo v 60,9 % případů. Při plánované radikální resekcii v 77,5 %.¹³² Což je srovnatelné s ostatními recentními studii používající kritéria z roku 2010, kde je udávána remise ve 46-70 % případů.¹³³⁻¹³⁶ K reoperaci pro leak cerebrospinalního moku došlo u 4,8 % nemocných a permanentnímu diabetu insipidu u 2 nemocných (1,9 %). K novému pooperačnímu hormonálnímu výpadku došlo u 10,5 % nemocných.¹³² Při operaci, pokud není kontraindikace, je vždy využívána intraoperační MR. Při použití intraoperační MR pokračovali neurochirurgové v resekcii u 15 % (12 osob) nemocných, kdy u 11,3 % (9 osob) bylo dosaženo kompletní remise.¹³² Invaze kavernózních splavů je pravděpodobně nezávislým prediktorem neúspěšnosti operace.¹³⁷ Primárně neoperabilní tumory nebo pacienti nevhodní pro chirurgický zákrok (např. ve špatném celkovém stavu) vyžadují další modalitě léčby.¹³⁵

4.2 Farmakologická léčba

4.2.1 Agonisté dopaminu

Agonisté dopaminu (DA) nejsou příliš efektivní léčbou. Suprese GH je dosaženo u 30 % a normalizace IGF-I ve 20 % pacientů. Lepší výsledky jsou zřejmé u adenomů se společnou sekrecí prolaktinu a při nízkém IGF-1, tedy méně aktivní akromegalii.^{138, 139}

4.2.2 Somatostatinová analoga a jejich receptory

Ve fyziologických podmínkách je sekrece GH regulována, blokována somatostatinem. Nativní somatostatin má velmi krátký biologický poločas, jenom 1-3 minuty. Somatostatinová analoga (SSA) oktreotid, vapreotid, lanreotid a seglitid mají poločas delší (1,5-2 hodiny), vyšší afinitu a rezistenci k peptidázám. V medicíně se používají od osmdesátých let. Dnes se používají jejich dlouho působící formy.

Somatostatin účinkuje přes své receptory. K dnešnímu datu známe pět forem somatostatinového receptoru (SSTR) 1 až 5. SSTR2 má 2 isoformy - SSTR2A a SSTR2B.¹⁴⁰ SSTR5 má 2 formy – s 4 nebo 5 transmembránovými doménami.¹⁴¹ Exprese SSTR je velice heterogenní mezi hypofyzárními adenomy. Oktreotid a lanreotid se preferenčně vážou na SSTR2 a slaběji nebo se střední afinitou na SSTR3 a SSTR5. Nové multiligandové somatostatinové analogum pasireotid má vysokou afinitu k SSTR v následující posloupnosti: SSTR5 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1.¹⁴²

Tabulka 4 Vazebná afinita k jednotlivým somatostatinovými receptorům¹⁴³

Vazebná afinita (EC50/nmol/l)	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Ligand – Somatostatin	0.93	0.15	0.56	1.5	0.29
Octreotid	280	0.38	7.1	>1000	6.3
Lanreotid	180	0.54	14	230	17
Pasireotid	9.3	1.0	1.5	>100	0.16

Stimulace různých somatostatinových receptorů aktivuje specifické nitrobuněčné cesty. Například, anti-proliferativní efekt je zprostředkován přes PI3K/AKT signalizační kaskádu, zejména při stimulaci SSTR2 nebo modulací mitogenem-aktivované proteinové kinázy (MAPK) přes SSTR1,2 a 5. Je možná i apoptóza skrze NF-kB-JNK-caspase kaskádu aktivovanou přes SSTR2 a 3 a SRL-AIP-ZAC1 cestou.¹⁴⁴

SSTR2 a SSTR5 jsou zapojeny především do regulace uvolňování somatotropinu a TSH.¹⁴⁵ SSTR5 pak i u PRL. V současné době používaná analoga somatostatinu, působící právě přes tyto 2 receptory, jsou používána jako medikamentózní léčba u akromegalie, TSH adenomů a neuroendokrinních tumorů.

Odpověď pacientů na somatostatinová analoga je velmi variabilní. Někteří dosáhnou úplné biochemické remise a významného zmenšení tumoru. Jiné jsou naopak na léčbu rezistentní.

4.2.3 Predikce odpovědi na farmakologickou léčbu

Předchozí úsilí k identifikaci charakteristických znaků, které by určily, zda adenom bude odpovídat na léčbu SSA, nedaly definitivní závěry.¹⁴⁶ Nebyla nalezena korelace rekurence ani odpovědi adenomu k SSA s velikostí, věkem, hladinou IGF-1, invazí okolních struktur

a kavernózního splavu nebo s přítomností adrenální insuficience v době diagnózy.^{147, 148} Efekt SSA je závislý na přítomnosti somatostatinových receptorů. Přítomnost SSTR byla dosud prokázána několika různými metodami.¹⁴³ Predominance SSTR5, následovaná SSTR2, 3 a 1 byla nalezena na úrovni mRNA. Viz. naše vlastní práce o expresi somatostatinových receptorů¹⁴⁹ - **Příloha 5**. Při použití imunohistochemických (polyklonální a monoklonální protilátky) metod dominuje v expresi SSTR2.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Exprese je sice vysoká, ale také velmi heterogenní. Nedávné studie ukázaly, že po léčbě následuje fenomén internalizace (snížení přítomnosti SSTR2 na membráně) spíše než opravdová down-regulace.¹⁵³ Toto není obvykle patrné na úrovni mRNA. Znalost a hodnocení pozice receptoru (membrána, cytoplazma) může hrát tedy roli v rozhodovacím algoritmu. Suprese GH koreluje s expresí SSTR2 in vitro.¹⁵⁴ Jiná studie hodnotila expresi SSTR2A u 25 nemocných s akromegalií¹⁵⁵, další pak společně s D2R u 88 nemocných. Pro ostatní typy SSTR korelace se supresí GH prokázána nebyla, přesto zůstává diskutována role SSTR5.^{143, 154, 156} Jelikož mohou receptory tvořit homo- a heterodimery, může být touto cestou posílena i aktivita receptoru. Při použití specifických analog pro SSTR2-5 můžeme dosáhnout lepší kontroly GH sekrece.¹⁵⁶ Nízký poměr SSTR2/SSTR5 byl naopak spojen se slabou odpovědí 1. generace SSA u akromegalie.¹⁴⁵ Stejně je se slabší odpovědí spojována přítomnost trunkovaných isoform SSTR5.¹⁵⁷ Studie hodnotící odpověď na léčbu SSA na základě přítomnosti nebo absence SSTR pomocí imunohistochemie a/nebo exprese mRNA dosud nepřinesly shodné výsledky. Fougner našel lepší odpověď k SSA při použití u nemocných předoperačně při pozitivitě SSTR2A imunohistochemicky, ale nepotvrdil western blottem.¹⁵⁸ V práci Taboady exprese SSTR2 mRNA korelovala s odpovědí na léčbu (snížení sekrece a velikosti tumoru) oktreotidem LAR. Negativní korelaci našel pro SSTR5.¹⁴⁵ Lepší odpověď k oktreotidu mají nemocní s vyšší expresí SSTR2 (mRNA nebo imunohistochemicky) i v dalších studiích.^{159, 160} Park et al. píše o pozitivní korelaci v odpovědi na léčbu oktreotidem pro SSTR2 i 5.¹⁶¹ Casarini analyzoval ostatní receptory a našel pozitivní korelaci mezi zmenšením tumoru (v %) a expresí SSTR1, SSTR2, a SSTR3, ale ne SSTR5. V jejich práci exprese stanovená imunohistochemicky korelovala s výsledky naměřenými real-time PCR.¹⁶² Z výše uvedeného lze předpokládat, že rozložení jednotlivých typů somatostatinových receptorů může vysvětlovat, a před zahájením léčby i predikovat, lepší léčebnou odpověď a dosud biologicky neuspokojivě vysvětlený anti-neoplastický účinek současně používaných somatostatinových analog.

4.2.4 Nežádoucí účinky

Tachyfylaxe během léčby octreotidem se pohybuje od kazuistických sdělení^{163, 164} až po 13 % v randomizovaných studiích.¹⁶⁵

4.2.5 Příloha 5. Drastíková M. et al. Expression profiles of somatostatin, dopamine, and estrogen receptors in pituitary adenomas determined by means of synthetic multilocus calibrators

Expression profiles of somatostatin, dopamine, and estrogen receptors in pituitary adenomas determined by means of synthetic multilocus calibrators

Monika Drastikova^a, Martin Beranek^{a,b}, Filip Gabalec^c, David Netuka^d, Vaclav Masopust^d, Tomas Cesak^e, Josef Marek^f, Vladimir Palicka^a, Jan Cap^c

Aims. Pituitary adenomas (PA) are non-invasive benign tumors with a high autopsy prevalence. They are classified according to the type of hormone secreted (prolactin, growth hormone, adrenocorticotropin, thyrotropin, folitropin, or luteinizing hormone). Clinically non-functioning adenomas (CNFA) lacking the typical hypersecretion of hormones make up a significant portion of PA. The aim of the study was to determine the complete expression profiles of somatostatin receptors (SSTR1–SSTR5), dopamine receptors type 2 (D2R), and estrogen receptors (ER1) in various types of PA.

Methods. Adenoma specimens were obtained from 206 patients during transsphenoidal resection. For quantitative analysis, reverse transcription and consequent real-time PCR with synthetic multilocus calibrators (SMC) were used. The obtained data were normalized to the number of transcripts of the beta-glucuronidase gene.

Results. The use of SMC enabled the alignment of individual calibration functions for all the receptors. No relationships between the expression of the receptors and the tumor size, site of extension, gender or age at diagnosis were significant. In growth hormone-secreting adenomas, *D2R* and *SSTR2* transcripts were extensively expressed, followed by *ER1*, *SSTR5*, *SSTR3*, and *SSTR1*. In patients with macroprolactinomas, transsphenoidal resection was indicated because dopamine agonists did not normalize prolactin levels. *D2R*, *ER1* and *SSTR1* transcripts were significantly transcribed. Corticotroph adenomas showed high levels of *D2R* and *ER1* transcripts and lower amounts of *SSTR2* and *SSTR1* transcripts. *SSTR5* transcripts were very low. Subjects with CNFA dominantly expressed *D2R* and *ER1*, followed by *SSTR2* and *SSTR3* mRNA.

Conclusion. We evaluated *SSTR1–SSTR5*, *D2R*, and *ER1* expressions in a large group of pituitary adenomas and we found that determining their individual expression profiles could help when choosing the optimal postoperative treatment.

Key words: pituitary adenoma, somatostatin receptor, dopamine receptor, estrogen receptor, real-time PCR, gene expression

Received: June 23, 2015; Accepted: November 11, 2015; Available online: November 24, 2015
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2015.058>

^aInstitute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

^bDepartment of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague

^c4th Department of Internal Medicine - Hematology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague and University Hospital Hradec Kralove

^dDepartment of Neurosurgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Central Military Hospital Prague

^eDepartment of Neurosurgery, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague and University Hospital Hradec Kralove

^f3rd Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Corresponding author: Martin Beranek, e-mail: beranek@lfhk.cuni.cz

INTRODUCTION

Pituitary adenomas (PA) are non-invasive benign tumors with a high autopsy prevalence ranging from 10 to 27% (ref.¹). They are classified according to the type of hormone secreted. The excess of prolactin produced by lactotroph adenomas leads to galactorrhoea, amenorrhoea, infertility, impotence, and hypogonadism. Overproduction of growth hormone (GH) in somatotroph adenomas causes acromegaly or gigantism, while high levels of adrenocorticotropin (ACTH) produced in corticotroph adenomas are associated with Cushing disease and thyrotroph adenomas secreting thyrotropin (TSH) can induce hyperthyreosis. Gonadotroph adenomas release folitropin (FSH) and/or luteinizing hormone (LH). Although clinically non-functioning adenomas (CNFA) are not as-

sociated with a typical hypersecretion of hormones, their mass effect results in an optic chiasm as a result of the oculomotor or abducens nerves being compressed, hydrocephalus, and orbital or sinonasal symptoms.

According to the type, location and size of the tumor, therapy of PA includes neurosurgical intervention and/or pharmacological treatment. As tumor recurrence appears in 40–50% of patients after transsphenoidal resection², treatment generally involves radiotherapy, somatostatin analogues (SA; i.e. long acting forms of octreotide and lanreotide or pasireotide) and dopamine agonists (DA, i.e., cabergoline, bromocriptine, quinagolide).

Somatostatin receptors (SSTR) are membrane G-proteins that mediate physiological functions of somatostatin in the body³. Overexpression of SSTR has been found in PA and many human malignancies^{4,5}. SSTR are

divided into five basic types: SSTR1 (*SSTR1* gene location 14q13), SSTR2 (17q24), SSTR3 (22q13.1), SSTR4 (20p11.2), and SSTR5 (16p13.3). Octreotide and lanreotide have a high affinity to SSTR2 and SSTR5, a middle affinity to SSTR3, and low affinity to SSTR1 and SSTR4. Pasireotide possesses an affinity to SSTR1, SSTR3, and SSTR5.

The extensive variability of somatostatin receptor expression in pituitary adenomas has been previously described⁶. Moreover, their expression could be influenced by the number of dopamine receptors type 2 (D2R) and estrogen receptors (ER1) in the membrane of the pituitary cells⁷⁻⁹.

The aim of the study was to determine the expression profiles of SSTR1–SSTR5, D2R, and ER1 receptors in a large group of pituitary adenomas of various clinical classifications. For quantitative analysis, real-time PCR and synthetic multilocus calibrators (SMC) were used.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The group of patients was made up of 105 men (22–82 years old; median 60) and 101 women (8–87 years old; median 57). Adenoma specimens were obtained from patients during transsphenoidal resection at the Neurosurgery Clinic, Central Military Hospital in Prague and the University Hospital in Hradec Kralove, Czech Republic. The collection and laboratory analysis were conducted with the informed consent of the patients in accordance with the requirements of the Clinical Research Ethics Committees. Diagnoses included 144 CNFA, 44 cases of acromegaly and nine cases of Cushing disease, six macroprolactinomas with low response to dopamine agonists, and three TSH-secreting adenomas. The group of CNFA was split into the following histo-pathological subgroups: gonadotroph adenomas ($n = 108$), silent ACTH tumors ($n=12$), plurihormonal tumors ($n = 10$), *null cell* adenomas ($n = 10$), and rare cases of clinically silent acromegaly and silent prolactinomas ($n = 4$).

The sizes of the adenomas ranged from 3 to 50 mm (median 23 mm). We collected 23 microadenomas (<10 mm) and 183 macroadenomas (>10 mm). Eighty-one tumors extended suprasellarly and into the *sinus cavernosus*, 79 extended suprasellarly, 17 intrasellarly, 13 suprasellarly and parasellarly, 8 into the *sinus cavernosus*, 6 suprasellarly, parasellarly and into the *sinus cavernosus*, and 2 parasellarly.

RNA extraction and reverse transcription

A portion of the tumor was used for pathological examination and the remaining part was submerged into a nucleic acid stabilizing solution (RNAlater Tissue Protect, Qiagen, Germany) and frozen at -80°C until RNA analysis. After tissue homogenization (MagNA Lyser, Roche Diagnostics, Germany), RNA was extracted by Trizol Reagent (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. To prevent DNA contamination, the RNA extracts were incubated at 30°C for 20 min with DNase

I Recombinant and Protector RNase Inhibitor (Roche Diagnostics, Germany). DNase I activity was consequently inactivated by adding 0.2M EDTA (pH 8) and heating at 75°C for 10 min. The RNA concentration and purity were controlled by ultraviolet spectrophotometry using Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Following the samples were reverse-transcribed to cDNA with the SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocol.

Preparation of synthetic multilocus calibrators

The sequence of the polynucleotide chain (IDT, USA) was composed of eight synthetic segments (Fig. 1) aligned as follows: *D2R* (segment I; 150 bp; NCBI reference sequence code NM_000795.3; positions 1281–1430), *SSTR1* (segment II; 210 bp; NM_001049.2; positions 1891–2100), *SSTR2* (segment III; 140 bp; NM_001050.2; positions 279–418), *SSTR3* (segment IV; 140 bp; NM_001051.4; positions 724–863), *SSTR4* (segment V; 240 bp; NM_001052.2; positions 1–240), *SSTR5* (segment VI; 142 bp; NM_001053.3; positions 1013–1154), *ER1* (segment VII; 307 bp; NM_000125.3; positions 954–1260), and beta-glucuronidase gene, *GUS* (segment VIII; 487 bp; NM_000181.3; positions 1708–2194). The complete chain was inserted into a pUC IDT cloning vector and the constructs were transferred into an *E. coli* competent strain and amplified (IDT, USA). This was followed by purification, spectrophotometric determination of plasmid DNA concentration, and freeze-drying. After reconstituting the freeze-dried DNA molecules in Tris-EDTA buffer, serial dilution (10^9 – 10^1 copies/ μL) in plastic tubes was performed. 20 μL aliquots of the diluted DNA were stored at -80°C .

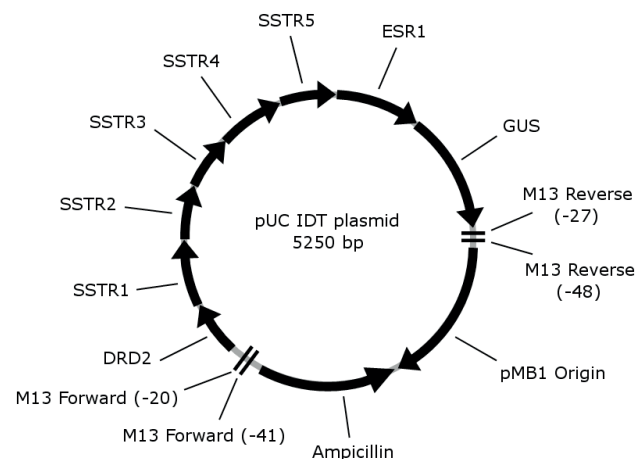


Fig. 1. Alignment of the inserted synthetic sequences in a pUC IDT cloning vector.

Real-time PCR

The master mix (25 μL) contained 12.5 μL TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 5 μL of cDNA, 300 nM of each primer and 200 nM of the hydrolysis fluorescent probe. The sequences of primers and probes for *SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3*, and *SSTR5* summarized in Table 1 have been previously published¹⁰. *SSTR4* and *ER1* analyses were performed using

Table 1. Sequences of the used primers and probes.

Name	Sequence (5' - 3')
<i>SSTR1</i> -fw	GCT AGG ACA CTG ACA GCC TTT GA
<i>SSTR1</i> -re	GTA GCC TGA AAG CCT TCC CA
<i>SSTR1</i> -probe	FAM-CCC AAG AAA GGC GCG CGA CAA T-TAMRA
<i>SSTR2</i> -fw	GCC TCC AGG GTC CAT TAA GG
<i>SSTR2</i> -re	ATT GAG TGG CTC ATC CGC C
<i>SSTR2</i> -probe	FAM-AGA ATA AGA TCT CTG GGC TGG CTG GAA-TAMRA
<i>SSTR3</i> -fw	TGG GCC TGC TGG GTA ACT
<i>SSTR3</i> -re	GAT GTA GAC GTT GGT GAC TGA AGG
<i>SSTR3</i> -probe	FAM-CAT CTA TGT GGT CCT GCG GCA CAC G-TAMRA
<i>SSTR5</i> -fw	CTG GTG CCA AGG ACG CT
<i>SSTR5</i> -re	GCT GCC GGA TCC TGT CTG
<i>SSTR5</i> -probe	FAM-ACG CCA CGG AGC CGC GT-TAMRA
<i>D2R</i> -fw	CAA GAC CAT GAG CCG TAG GAA G
<i>D2R</i> -re	TGT GTG TGA TGA AGA AGG GCA G
<i>D2R</i> -probe	FAM-CCC AGC AGA AGG AGA AGA AAG CCA CTC A-TAMRA

Taqman Gene Expression Assays Hs01566620_s1 and Hs00174860_m1 (Invitrogen, USA). The number of *GUS* transcripts was investigated using an *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc (GUS) Kit (Qiagen, Germany).

Quantitative real-time PCR was performed in a RotorGene 6000 thermal cycler (Corbett Research, Australia) under the following conditions: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, then 50 cycles consisting of 95 °C 15 s for denaturation and 60 °C 1 min for both annealing and extension. For the calibration process, diluted SMC aliquots in a range of 10⁶-10¹ copies/μL were used. Specimens were tested in duplicate. The obtained data were normalized to the number of *GUS* transcripts and the results are given in arbitrary units.

Statistical analysis

The calculations were carried out by Statistica, version 12 (StatSoft, Czech Republic) and MedCalc, version 5

(MedCalc Software, Belgium). The normality of values was evaluated by the Shapiro-Wilk W test. Data analysis was performed by using the Mann-Whitney U test. Co-expressions of receptors were evaluated by the Spearman rank correlation. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The preparation of SMC enabled us to perform calibration procedures for all the receptors using the same concentration series with no doubts as to their comparability to each other. As demonstrated in Table 2, reaction slopes, efficiencies, and regression coefficients of the receptor assays were very similar. Cycle thresholds (CT) for each calibration point varied in 2-3 cycles.

Table 2. Parameters of calibration functions.

Transcript	Calibration function#				Cycle thresholds (CT) for calibration points DNA copy numbers per reaction				
	Slope	Intercept	r	Efficiency	5x10 ⁶	5x10 ⁵	5x10 ⁴	5x10 ³	5x10 ²
<i>SSTR1</i>	-3.42	42.20	0.999	1.96	19.4	22.6	26.1	29.5	33.0
<i>SSTR2</i>	-3.38	42.87	0.980	1.98	20.4	23.6	26.9	30.0	33.8
<i>SSTR3</i>	-3.38	40.05	0.999	1.98	17.6	20.7	23.9	27.3	31.1
<i>SSTR4</i>	-3.31	40.84	0.999	2.00	18.6	21.9	25.3	28.7	32.2
<i>SSTR5</i>	-3.53	42.02	0.999	1.92	18.4	21.9	25.4	28.8	32.5
<i>D2DR</i>	-3.43	42.46	0.999	1.95	19.5	22.8	26.2	29.9	33.2
<i>ER1</i>	-3.46	40.64	0.999	1.94	17.5	20.9	24.2	27.9	31.3
<i>GUS</i>	-3.64	42.51	0.999	1.90	18.1	21.7	25.4	29.0	32.7

#common format of a calibration curve: CT = slope * log(concentration) + intercept; threshold 0.05; r = regression coefficients

SSTR1-SSTR3, *D2R*, and *ER1* mRNA were expressed in all 206 examined adenomas. *SSTR4* and *SSTR5* transcripts were detectable in 72% and 81% of them, respectively. The absolute quantity of *GUS* transcripts in the mixtures moved from 1816 to 778305 copies (median 17354 copies). Normalized expressions of the genes ranged from 0.2 to 26796 for *SSTR1*, 0.8-5348 for *SSTR2*, 0.1-1041 for *SSTR3*, 0-54 for *SSTR4*, 0-1395 for *SSTR5*, 0.2-17356 for *D2R* and 0.1-14359 for *ER1*. No significant differences in expression levels between men and women were observed. Also, no dependence of the expressions on the age at diagnosis was found.

The numbers of *D2R*, *ER1*, and *SSTR1* transcripts were highest in the subjects with Cushing disease and prolactinomas (Mann-Whitney U test, $P < 0.001$, Table 3). *SSTR2* expression was significantly higher in acromegaly and TSH-secreting adenomas than in the others ($P < 0.001$). *SSTR3*, *SSTR4*, and *SSTR5* expressions in PA were lower in general. Significantly more *SSTR3* transcripts were found in CNFA and acromegaly than in other PA types ($P = 0.002$ and $P = 0.008$, respectively), while relatively higher levels of *SSTR5* were found in patients with acromegaly and prolactinomas.

Table 3. Normalized expression of receptors (median values) in pituitary adenomas.

	GH (n=44)	PRL (n=6)	CORTI (n=9)	CNFA (n=144)	TSH (n=3)
<i>SSTR1</i>	12	130	46	7	11
<i>SSTR2</i>	174	18	49	25	551
<i>SSTR3</i>	14	1	7	23	0
<i>SSTR4</i>	0	0	1	0	1
<i>SSTR5</i>	17	17	2	0	0
<i>D2R</i>	516	3172	1099	325	440
<i>ER1</i>	32	1665	607	54	68

GH growth hormone secreting adenomas, PRL prolactinomas, CORTI corticotroph adenomas, CNFA clinically non-functioning adenomas, TSH thyrotropin secreting adenomas

The median size of CNFA was 24 mm (in a range of 10-50 mm, except for one 7 mm adenoma associated with cephalaea and hemianopsia), 16 mm in GH-secreting adenomas (3-40 mm), 8 mm in corticotroph adenomas (4-30 mm), 24 mm in prolactinomas (9-56 mm), and 24 mm in thyrotroph adenomas (5-30 mm). No relationships between the expression and the tumor size or sites of the extension were significant.

When evaluating co-expressions of the receptors, positive Spearman rank correlations between *ER1* and *D2R* ($r = 0.51$; $P < 0.001$; Fig. 2, left part), and between *SSTR2* and *D2R* ($r = 0.41$; $P < 0.001$; Fig. 2, right part) in PA were observed. Other relationships among the receptors were weak or missing. With the exception of *ER1* and *D2R* ($r = 0.69$, $P < 0.001$), we found no significant co-expressions of the receptors in the group of CNFA group.

DISCUSSION

Laboratory testing of SSTR or other receptors is traditionally performed via autoradiography and immunohistochemistry^{8,11-13}. Results obtained by these methods are, however, influenced by the variety of usable epitopes, by the heterogeneous dimerization and distribution of receptors, and by their internalization and diffusion into the cytosol and/or endosomes¹⁴. Therefore, no correlations between the results of immunohistochemical analysis and the number of RNA transcripts in pituitary adenomas have been found¹⁵. Despite providing no information about the tissue morphology, real-time PCR could provide more precise quantitative data on *SSTR*, *D2R*, and *ER1* expression profiles if the proper calibration process is used and if normalization to a house-keeping gene is carried out.

Calibration standards are commonly prepared by inserting the appropriate DNA or RNA fragments into individual vectors and performing a series of molecular cloning procedures. The spectrophotometric analysis of the amounts of fragments in the standards depends on the imprecision of the method impairing the homogeneity of calibrations and on the reliability of the data obtained.

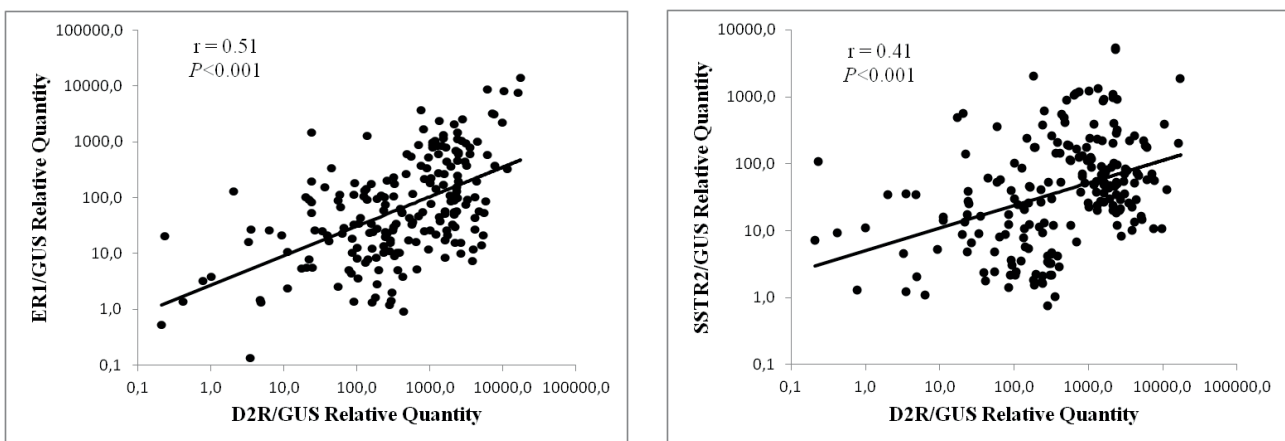


Fig. 2. Co-expressions of *ER1* and *D2R* (left part) and *SSTR2* and *D2R* (right part) genes in PA drawn in the logarithmic scale.

Our newly developed calibration method uses gene synthesis technology along with the insertion of several DNA fragments into a single cloning vector. This approach ensures equivalent copy numbers of *SSTR1-5*, *D2R*, *ER1*, and *GUS* fragments in the prepared calibration standards.

For normalization we chose the *GUS* house-keeping gene. Compared with other reference genes (*G3PDH*, beta-actin, *HPRT*, cyclophilin) (ref.^{6,7}), a lower expression of the *GUS* gene in the pituitary tissue enables the *SSTR*, *D2R*, and *ER1* values to be distributed on a wider scale, from units to hundreds of thousands of arbitrary copy numbers.

Cytoplasmatic SSTR mediate physiological functions of somatostatin in the body, including modulation of endocrine and exocrine secretion, inhibition of cell proliferation (*SSTR1*, *SSTR2*, and *SSTR5*), and initiation of apoptosis (*SSTR3* and partly *SSTR2*) (ref.^{12,16}). In our group of 44 subjects suffering from acromegaly, *D2R* and *SSTR2* transcripts were extensively expressed, with *ER1*, *SSTR5*, *SSTR3*, and *SSTR1* lesser so expressed. Similar results focusing exclusively on SSTR receptors have been published by others^{6,17}. The same profile also showed the three patients with rare TSH-secreting PA.

Octreotide and lanreotide are somatostatin analogues with a specific affinity to *SSTR2* and *SSTR5*. If used in acromegaly treatment (transsphenoidal resection is the primary treatment), they normalize GH levels in up to 70% cases of GH-secreting PA (ref.¹⁸); SA-resistant acromegaly expresses lower amounts of *SSTR2* mRNA (ref.¹⁹). Finding high levels of *D2R* in these subjects leads to the consideration of DA as a means for overcoming SA-resistance²⁰.

Prolactinomas are primarily treated with DA that enable the normalization of elevated prolactin levels in 90% of cases involving microprolactinomas and 70% of macroprolactinomas¹⁶. In our series of macroprolactinomas, transsphenoidal resection was indicated because DA did not normalize prolactin levels. Despite this, we observed the highest levels of *D2R* in these tumors out of all those tested. Also, we found in them a high expression of *ER1* and *SSTR1* genes. The associations between *ER1* and *SSTR* co-expressions have been previously described in CNFA⁷. Since estrogen hormones induce the transcription of *SSTR2* and *SSTR3* genes^{8,21}, the administration of ER1 modulators should probably increase the chance of inhibiting prolactin synthesis in DA-resistant prolactinomas. In such a therapeutic approach, the expression profile (*SSTR*, *D2R*, and *ER1*) and serum prolactin concentrations should be measured²².

The first line of treatment of ACTH-secreting adenomas is transsphenoidal resection. The data published so far has shown a dominant expression of *SSTR5* and *D2R* and lower levels of *SSTR2* transcripts in this type of PA (ref.²³). Therefore, preoperative reduction of ACTH and consequent reduction of cortisol levels in the body could be reached by SA (pasireotide) or DA (ref.^{24,25}). In our study we investigated nine corticotroph adenomas. In their expression profiles, high levels of *D2R* and *ER1* dominated; *SSTR2* and *SSTR1* transcripts were significantly lower in them. *SSTR5* copy numbers were very low, in three subjects even under the assay detection limit.

Considering the significant elevation of *D2R* receptors in these tumors, therapy by cabergoline should be a more effective postoperative approach, although it would not be effective in the long term²⁶.

Most subjects in the study were diagnosed as CNFA with a high expression of *D2R* and *ER1*, followed by *SSTR2* and *SSTR3*. The amounts of *SSTR1*, *SSTR4*, and *SSTR5* transcripts were significantly lower, as reported earlier^{5,7}. Moreover, CNFA are primarily treated by transsphenoidal resection. Relapses after complete extraction appear in 13% of individuals. In the case of postoperative residuum, the risk of a relapse rises to 41% (ref.²⁷). Early postoperative radiotherapy decreased tumor recurrence. If *D2R* expression in PA is sufficient, the DA postoperative treatment could be considered. Unfortunately, our data showed that *D2R* expression in CNFA is lower than in prolactinomas, which would thus limit wider usage of DA in the postoperative treatment and primary pharmacological treatment of CNFA.

CONCLUSION

In conclusion, we have evaluated complete *SSTR1-5*, *D2R*, and *ER1* expression profiles in the largest group of resected pituitary tumors (to our knowledge) ever collected. Since the therapeutic effect of the mentioned hormone analogues, agonists, and modulators depends on the quantity and functionality of the appropriate receptors, determining their individual expression profiles could prove beneficial when choosing the optimal postoperative treatment for pituitary adenomas.

Acknowledgement: The study was supported by the project MZ ČR - RVO (FNHK, 00179906) of the Ministry of Health, Czech Republic, by the grant SVV 260057/2014, and by the project PRVOUK P37/09 and PRVOUK P37/11 of the Charles University in Prague, Czech Republic.

Author contributions: MD, FG: literature search; MB, MD, FG, JM, JC: manuscript writing; FG, MD, MB, VP: study design; MD, MB: data collection; MB, MD, FG: data analysis; FG, DN, VM, TC, JC: data interpretation; MB: statistical analysis, figures.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

1. Dekkers OM, Pereira AM, Romijn JA. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3717-26.
2. Losa M, Mortini P, Barzaghi R, Ribotto P, Terreni MR, Marzoli SB, Pieralli S, Giovannelli M. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenoma and analysis of the risk of tumor recurrence. *J Neurosurg* 2008;108:525-32.
3. Kahir M., Dworakowska D, Grossman A. Somatostatin receptor biology in neuroendocrine and pituitary tumours: part 1 – molecular pathways. *J Cell Mol Med* 2010;14:2570-84.
4. Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW. Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43:27-35.

5. Cakir M., Dworakowska D, Grossman A. Somatostatin receptor biology in neuroendocrine and pituitary tumours: part 2 – clinical implications. *J Cell Mol Med* 2010;14:2585-91.
6. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimarães RF, Marcondes JB, Chimelli LM, Fontes R, Mata PJ, Filho PN, Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007;156:65-74.
7. Nishioka H, Tamura K, Iida H, Kutsukake M, Endo A, Ikeda Y, Haraoka J. Co-expression of somatostatin receptor subtypes and estrogen receptor- α mRNAs by non-functioning pituitary adenomas in young patients. *Mol Cell Endocrinol* 2011;331:73-8.
8. Visser-Wisselaar HA, Van Uffelen CJ, Van Koetsveld PM, Lichtenauer-Kaligis EG, Waaijers AM, Uitterlinden P, Mooy DM, Lamberts SW, Hofland LJ. 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;138:1180-9.
9. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999;20:157-98.
10. O'Toole D, Saveanu A, Couvelard A, Gunz G, Enjalbert A, Jaquet P, Ruszniewski P, Barlier A. The analysis of quantitative expression of somatostatin and dopamine receptors in gastro-entero-pancreatic tumours opens new therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol* 2006;155:849-57.
11. Korner M, Waser B, Schonbrunn A, Perren A, Reubi JC. Somatostatin receptor subtype 2A immunohistochemistry using a new monoclonal antibody selects tumors suitable for in vivo somatostatin receptor targeting. *Am J Surg Pathol* 2012;36:242-52.
12. Pisarek H, Kunert-Radek J, Radek M, Swietoslowski J, Winczyk K, Pawlikowski M. Expression of somatostatin receptor subtypes in primary and recurrent gonadotropinomas: are somatostatin receptors involved in pituitary adenoma recurrence? *Neuro Endocrinol Lett* 2011;32:96-101.
13. Peineau S, Guimiot F, Csaba Z, Jacquier S, Fafouri A, Schwendimann L, de Roux N, Schulz S, Gressens P, Auvin S, Dournaud P. Somatostatin receptors type 2 and 5 expression and localization during human pituitary development. *Endocrinology* 2014;155:33-9.
14. Waser B, Cescato R, Liu Q, Kao YJ, Körner M, Christ E, Schonbrunn A, Reubi JC. Phosphorylation of sst2 receptors in neuroendocrine tumors after octreotide treatment of patients. *Am J Pathol* 2012;180:1942-9.
15. Gonzalez B, Vargas G, Ramirez C, Asa S, Cheng S, Sandoval C, Mercado M. Cytoplasmic expression of SSTR2 and 5 by immunohistochemistry and by RT/PCR is not associated with the pharmacological response to octreotide. *Endocrinol Nutr* 2014;61:523-30.
16. Colao A, Pivonello R, Di Somma C, Savastano S, Grasso LF, Lombardi G. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10:111-23.
17. Nielsen S, Mellekjær S, Rasmussen LM, Ledet T, Olsen N, Bojsen-Møller M, Astrup J, Weeke J, Jørgensen JO. Expression of somatostatin receptors on human pituitary adenomas in vivo and ex vivo. *J Endocrinol Invest* 2001;24:430-7.
18. Colao A, Auriemma RS, Lombardi G, Pivonello R. Resistance to somatostatin analogs in acromegaly. *Endocr Rev* 2011;32:247-71.
19. Taboada GF, Luque RM, Neto LV, Machado Ede O, Scaffi BC, Domingues RC, Marcondes JB, Chimelli LM, Fontes R, Niemeyer P, de Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol* 2008;158:295-303.
20. Colao A. The importance of presurgical somatostatin analogue therapy in acromegaly. *Endokrynol Pol* 2007;58:356-60.
21. Djordjijevic D, Zhang J, Priam M, Viollet C, Gourdji D, Kordon C, Epelbaum J. Effect of 17beta-estradiol on somatostatin receptor expression and inhibitory effects on growth hormone and prolactin release in rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 1998;139:2272-7.
22. Molitch ME. Management of medically refractory prolactinoma. *J Neurooncol* 2014;117:421-8.
23. de Bruin C, Pereira AM, Feelders RA, Romijn JA, Roelfsema F, Spruij-Mooij DM, van Aken MO, van der Lelij AJ, de Herder WW, Lamberts SW, Hofland LJ. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1118-24.
24. Pivonello R, Ferone D, de Herder WW, Kros JM, De Caro ML, Arvigo M, Annunziato L, Lombardi G, Colao A, Hofland LJ, Lamberts SW. Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2452-62.
25. Boscaro M, Ludlam WH, Atkinson B, Glusman JE, Petersenn S, Reincke M, Snyder P, Tabarin A, Biller BM, Findling J, Melmed S, Darby CH, Hu K, Wang Y, Freda PU, Grossman AB, Frohman LA, Bertherat J. Treatment of pituitary dependent Cushing's disease with the multi-receptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:115-22.
26. Pivonello R, De Martino MC, Cappabianca P, De Leo M, Faggiano A, Lombardi G, Hofland LJ, Lamberts SW, Colao A. 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;94:223-30.
27. Greenman Y, Stern N. How should a nonfunctioning pituitary macroadenoma be monitored after debulking surgery? *Clin Endocrinol* 2009;70:829-32.

4.3 Radioterapie a pegvisomant

Pegvisomant je antagonist receptoru pro GH. Používá se v případě selhání terapie SSA nebo v kombinaci s nimi k redukci dávek. Radioterapie Leksellovým gama nožem je rovněž používána, zejména v naší zemi.¹¹² S dostupností farmakologických modalit je od radioterapie odklon. Pro velké agresivní a invazivní tumory však stále zůstává metodou důležitou. Než se dostaví efekt radioterapie, je ve většině případů farmakologická léčba nezbytná.

5 Cíle

5.1 Proteomická analýza klinicky afunkčních adenomů

Cílem je porovnání proteinového složení klinicky afunkčních adenomů bez progresse a s progresí po operaci pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS).

- 1) Zavedení postupu pro zpracování vzorků tkáně.
- 2) Provedení „průzkumné“ LC-MS analýzy.
- 3) V případě dostatečného pokrytí proteomu daným postupem pilotní komparativní analýza vzorků od pacientů s a bez progresse.

5.2 Korelace dysregulovaných proteinů a receptorů zjištěných proteomickou analýzou s imunohistochemickým vyšetřením u adenomů hypofýzy

- 1) Stanovení exprese dysregulovaných proteinů, zjištěných při LC-MS analýze, pomocí imunohistochemických metod u hypofyzárních – klinicky funkčních adenomů – bez progresse a s progresí po operaci.
- 2) Korelace výsledků imunohistochemie s výsledky proteomické analýzy.

5.3 Korelace exprese somatostatinových receptorů a dopaminového receptoru 2 typu mezi imunohistochemií a real-time PCR

- 1) Cílem je ověřit korelaci exprese mRNA zjištěné pomocí PCR s imunohistochemickými metodami. Použití imunohistochemických metod by nevyžadovalo paralelní odběr tkáně do medií stabilizujících RNA a zjednodušilo by tak celý postup.

6 Metodika

Všechny cíle byly řešeny v rámci grantových projektů, byly prováděny za souhlasu etické komise a nemocní podepsali před odběrem vzorku informovaný souhlas.

6.1 Proteomická analýza

Průzkumná analýza. V 3 % roztoku deoxycholátu sodného bylo v homogenizátoru zpracováno cca 20 mg tkáně. Pomocí BCA metody byla zjištěná celková koncentrace proteinů v lyzátu a 100 ug vzorku bylo dále zpracováno pro LC-MS analýzu. V prvním kroku byly redukovány a alkylovány volné thiolové skupiny cysteinů. Poté byl použit protokol pro kombinovaný digest pomocí dvou proteáz – LysC a trypsinu (Promega, USA). Peptidy získané štěpením byly přečištěny na C18 kolonkách a rozpuštěny pro LC-MS analýzu. Tato byla provedena na analytickém systému, který využívá nanokapalinový chromatograf Ultimate3000 RSLCNano (Thermo Scientific, Německo) pro separaci komplexních směsí peptidů. Eluent z analytické kolony byl poté přímo sprejován do hmotnostního spektrometru Q Exactive Plus (Thermo Scientific), kde jsou peptidy detekovány a sekvenovány. V případě této analýzy bylo nastříknuto 500 ng vzorku, který byl nejdříve zkoncentrován a odsolen na trap kolonce 75 um x 2 cm, C18, 2 um (Thermo Scientific) a následně analyzován na analytické koloně 75 um x 15 cm, C18, 1.7 um částice (Waters, UK) pomocí gradientové eluce od 4–37% acetonitrilu během 120min. Analýza byla provedena v triplicátu a získaná spektrální data byla analyzována pomocí softwaru Proteome Discoverer (Thermo Scientific). Pro identifikaci MSMS spekter byla použita aplikace Mascot (Matrix Science, UK) a validace výsledků pak byla provedena pomocí aplikace Percolator (Science for Life Laboratory, KTH, Švédsko), která byla nastavena na reportování výsledků na hladině odpovídající maximálně 1 % falešně pozitivních identifikací.

Komparativní analýza. Zpracování vzorků probíhalo analogicky jako v kroku 2), nicméně pro potřeby komparativní analýzy byly peptidy po naštěpení proteázami naznačeny pomocí isobarických značek TMT6plex (Thermo Scientific). Tyto značky se kovalentně váží na volné aminové skupiny peptidů a během analýzy pak uvolňují tzv. reportérové značky, které umožňují relativní multiplexovou kvantifikaci proteinů až napříč 6 vzorky během jedné analýzy. Po naznačení peptidů bylo všech 6 vzorků smícháno do jediného, který byl dále analyzován.

Díky zavedení metodiky dvoudimenzionální kapalinové chromatografie na CBV jsme se rozhodli nad rámec projektu aplikovat technologii i do tohoto projektu. Vzhledem k lepší frakcionaci a separaci peptidů se díky této metodě lze dostat na mnohem hlubší pokrytí studovaného proteomu. Vzorek naznačený TMT6plex značkami byl tedy nejdříve frakcionován na koloně XBridge C18, 3 μ m, 2.1x150mm (Waters) v systému pufrů voda/acetonitril/mravenčan amonný. Eluované peptidy byly sbírány po minutových frakcích, přičemž bylo celkem nasbíráno 32 frakcí, které byly následně smíchány po čtyřech metodou nejvzdálenějšího souseda. Finálních 8 frakcí pak bylo v triplikátu analyzováno a vyhodnoceno analogickou metodikou jako v bodě 2). Díky použité dvoudimenzionální chromatografii bylo výsledkem mnohem hlubší pokrytí proteomu mozkové tkáně. Proteiny jsou označeny přístupovými kódy z databázi UniProt (www.uniprot.org).

6.2 Imunohistochemické/histopatologické vyšetření

Vzorky tkáně jsou po odběru fixovány v 10 % formalinovém roztoku a připraveny pro rutinní histopatologické vyšetření. Imunohistochemická analýza je následně provedena na pracovišti s bohatými zkušenostmi s prováděním imunohistochemického vyšetření (Fingerlandův ústav patologie). Metodika byla částečně již popsána v publikacích z našeho pracoviště.^{95, 125} Stručně, řezy 5 μ m tlusté jsou obarveny hematoxylin-eozinem. Další použité barvení je Gömöriho stříbření k obarvení vaziva. Další řezy jsou použity k imunohistochemickému vyšetření. Tyto řezy jsou vystaveny nízkému pH (citrátový pufr - pH 6,0) nebo teplému prostředí za účelem vychytání antigenu. Barvení je prováděno pomocí Benchmark Ultra stainer (Ventana, Roche) nebo manuálně dle protokolu pro jednotlivé protilátky. Některé protilátky musí být nově zavedeny za účelem projektu. Barveny a vyšetřovány jsou hormony ACTH, GH, prolaktin, specifické β podjednotky dimerických glykoproteinů TSH, FSH, LH a jejich společná α -podjednotka. Dále proliferální marker Ki-67, p53. Od roku 2018 jsou používány protilátky proti transkripčním faktorům zahrnutým ve vývoji hypofýzy Pit1, T-Pit, SF1 a GATA2. Exprese hormonů a transkripčních faktorů je hodnocena jako pozitivní nebo negativní a nádory jsou klasifikovány dle WHO klasifikace (World Health Organization (WHO) classification system of tumours of endocrine organs using haematoxylin-eosin and IHC staining). Je hodnocena intenzita barvení, ale i lokalizace receptoru (membrána, cytoplasma, jádro). Exprese jednotlivých receptorů je hodnocena semikvantitativně ve 4 stupních: 0 – absolutně negativní, 1 – lehká pozitivita v méně než 25 % buněk, 2 – pozitivita do 50 % buněk a 3 – silná pozitivita do 75 % a 4 – více jak 75 % buněk. Pro účely cíle 5.2 bylo zavedeno a kalibrováno použití nových protilátek Anti-TPPP3

antibody produced in rabbit (Sigma, HPA047629), Anti-Alpha Internexin antibody (AB7654) a Anti-Ubiquitin antibody (AB179434). Exprese pak byla patologem hodnocena semikvantitativně ve 4 stupních: 0: absolutně negativní; 1: lehká pozitivita v <15 % buněk; 2: pozitivita v 15-70 % buněk; a 3: silná pozitivita v >70 % buněk. Pro účely cíle 5.3 bylo zavedeno použití nových protilátek Anti-SSTR2 antibody produced in rabbit (HPA007264, Sigma) a anti-SSTR5 antibody (SAB2900524, Sigma).

6.3 Real-time PCR

Real-time PCR nebyla součástí této práce, v práci je však využito dat z prací předchozích. V minulosti jsme pro analýzu vytvořili i unikátní syntetický multilokusový kalibrátor. Detailně shrnuje práce v **příloze 5** a naše další práce.¹⁶⁶ **Příloha 6.**

6.3.1 Příloha 6. Beránek M. et al. Syntetický multilokusový kalibrátor pro studium genové exprese v nádorech hypofýzy vyvolávajících akromegalii.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

SYNTECKÝ MULTILOKUSOVÝ KALIBRÁTOR PRO STUDIUM GENOVÉ EXPRESY V NÁDORECH HYPOFÝZY VYVOLÁVAJÍCÍCH AKROMEALII

MARTIN BERÁNEK^{a,b}, MONIKA DRASTÍKOVÁ^a,
FILIP GABALEC^c, VLADIMÍR PALIČKA^a
a JAN ČÁP^c

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, ^b Katedra biochemický věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, ^c 4. Interní hematologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové
beranek@lfhk.cuni.cz

Došlo 7.6.15, přijato 26.6.15.

Klíčová slova: kalibrátor, genová syntéza, receptor, hypofýza, akromegalie, exprese

Úvod

Analýza exprese genu nebo skupiny vytipovaných genů slouží v současné medicíně nejen k diagnostickým účelům, ale též k určení vhodného terapeutického postupu a ke kontrole úspěšnosti léčby. Příkladem může být sledování počtu fúzních transkriptů BCR-ABL v krvi pacientů s chronickou myeloidní leukémií¹, vyšetření inzulinových hybridních receptorů u diabetiků² či určení exprese estrogenových receptorů u žen s diagnostikovaným nádorem prsní žlázy³.

V posledních deseti letech došlo k rozvoji nových skupin léčiv, jejichž struktura je odvozena od hormonů a neurotransmiterů přítomných v lidském organismu. Rozšíření této tzv. cílené biologické léčby znásobilo počty klinických požadavků na analýzu exprese tkáňových receptorů, na které se podaná léčiva váží. Získaný výsledek vyšetření podmiňuje správnost indikace této nákladné léčby pro konkrétního pacienta.

Cílená terapie se využívá také u nádorů hypofýzy⁴. Mezi podávaná léčiva patří somatostatinová analoga (oktreotid, lanreotid, pasireotid), agonisté dopaminu (kabergolin, bromokriptin) a estrogenové modulátory (raloxifen). Dopaminergní agonisté jsou léky první volby u prolaktinomů, tj. adenomů hypofýzy sekretujících hormon prolaktin. U adenomů produkujících růstový hormon, adrenokortikotropní hormon či tyreotropin, a též u klinicky

afunkčních adenomů, může cílená léčba sloužit ke zmenšení nádorového ložiska před jeho chirurgickým odstraněním. Znalost exprese somatostatinových receptorů 1–5 (SSTR1–SSTR5), dopaminového receptoru typu 2 (D2R) a estrogenového receptoru (ER1) v odoperované tkáni představuje možnost, jak pomocí vhodně zvolené farmakoterapie snížit riziko nádorových recidiv⁵.

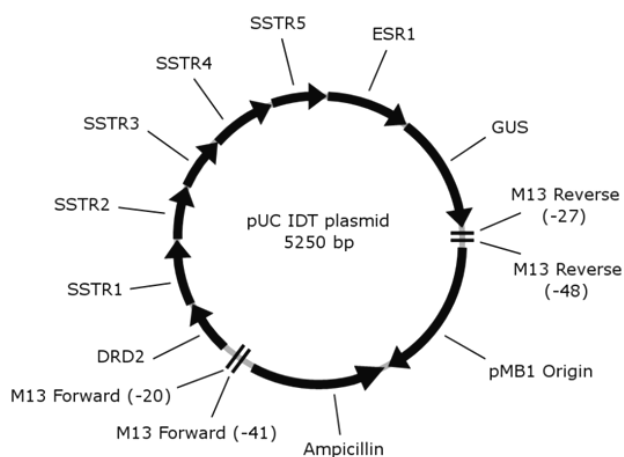
Vyšetření exprese receptorů v resekované tkáni lze provést pomocí autoradiografických a imunohistochemických vyšetření^{6,7}. Alternativní metodou je určení míry transkripce genů pro příslušné receptory. V současnosti se pro tyto účely nejčastěji používá postup zahrnující reverzní transkripci a PCR provedenou v reálném čase, real-time PCR⁸. Výsledek vyšetření se kvůli nestabilitě molekul mRNA normalizuje na množství transkriptů referenčních genů přítomných ve vzorku a vyjadřuje se bezrozměrně. Pokud se hodnotí exprese několika genů současně, a pokud používané reakce nemají stejnou amplifikační účinnost, je pro spolehlivou kvantitativní analýzu nutné provést kalibrace všech používaných metod. Potřebný kalibrační materiál se získává molekulovým klonováním⁹; počty kopií genů obsažené v kalibrátorech se odhadují spektrofotometricky. Nejistota těchto odhadů přispívá k variabilitě výsledků exprese studovaných receptorů.

Cílem této studie bylo navrhnout unikátní multilokusový kalibrátor obsahující specifické sekvence genů *SSTR1–SSTR5*, *D2R*, *ER1* a referenčního genu pro glukuronidasu (*GUS*). K přípravě multikalibrátorů byly použity metody genové syntézy a skládání segmentů DNA do jednoho řetězce^{10,11}. Vyšetřený soubor vzorků zahrnoval adenomy hypofýzy s nadprodukcí somatotropního hormonu vyvolávajícího příznaky akromegalie. Incidence tohoto nádorového onemocnění v ČR je 20–40 případů ročně.

Experimentální část

Příprava syntetických multikalibrátorů

Struktura polynukleotidového řetězce kalibrátorů se skládala z osmi syntetických segmentů (IDT, USA), jejichž řazení bylo následující: *D2R* (segment I; 150 bp; přístupový kód v NCBI databázi NM_000795.3; pozice 1281–1430), *SSTR1* (segment II; 210 bp; NM_001049.2; pozice 1891–2100), *SSTR2* (segment III; 140 bp; NM_001050.2; pozice 279–418), *SSTR3* (segment IV; 140 bp; NM_001051.4; pozice 724–863), *SSTR4* (segment V; 240 bp; NM_001052.2; pozice 1–240), *SSTR5* (segment VI; 142 bp; NM_001053.3; pozice 1013–1154), *ER1* (segment VII; 307 bp; NM_000125.3; pozice 954–1260) a *GUS* (segment VIII; 487 bp; NM_000181.3; pozice 1708–2194). Celý řetězec o délce 1816 bp (obr. 1) byl jako inzert použit pro molekulové klonování, jehož detaily jsme po-



Obr. 1. Pořadí syntetických genových segmentů v klonovacím vektoru pUC IDT

psali dříve¹². Ze získaných molekul DNA byla pomocí ředící řady vytvořena série multikalibračních vzorků s koncentrací 10^6 – 10^1 kopií/ μ l. Při každé kalibraci byl daný standard použit vždy dvakrát.

Soubor vyšetřených vzorků

Soubor osob byl složen z 22 mužů a 22 žen s mediánem věku 51 roků (rozsah 26–76 roků). Všichni byli indikováni k operaci pro diagnózu akromegalie způsobenou nadměrnou sekrecí růstového hormonu a následně inzulinu podobnému růstového faktoru I. Ve studii byly použity vzorky 44 adenomů získané při jejich resekci. Velikost nádorů určená zobrazovacími technikami se pohybovala od jednoho do čtyř centimetrů. Studie byla schválena etickou komisí a pacienti před operací podepsali informovaný souhlas.

Extrakce RNA a reverzní transkripce

Část resekovaného nádoru byla ihned po vyoperování vložena do zkumavky se stabilizačním roztokem RNeasy Lysis Reagent (Qiagen, SRN) a uchovávána při teplotě -80 °C. Izolace RNA byla provedena s použitím roztoku Trizol Reagent (Invitrogen, USA). Po izolaci proběhla inkubace extraktu s DNase I (Roche Diagnostics, SRN) při 30 °C po dobu 20 min. Koncentrace a čistota extraktů byly určeny pomocí UV spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Pro reverzní transkripci byla použita souprava SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, USA).

Real-time PCR

Reakční směs o objemu 25 μ l obsahovala $12,5$ μ l komerční směsi TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), oba primery o koncentraci 300 nmol l^{-1} , hydrolytickou sondu o koncentraci 200 nmol l^{-1}

a 5 μ l cDNA. Sekvence primerů a sond pro *SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3* a *SSTR5* byly získány z literatury¹³. Přímý primer pro *D2R* receptor měl strukturu $5'$ - CAA GAC CAT GAG CCG TAG GAA G $-3'$, zpětný primer $5'$ - TGT GTG TGA TGA AGA AGG GCA G $-3'$ a sonda $5'$ - FAM-CCC AGC AGA AGG AGA AGA AAG CCA CTC A-TAMRA $-3'$. Pro analýzu *SSTR4* a *ERI* jsme použili komerční soupravy Taqman Gene Expression Assay Hs01566620_s1 a Taqman Gene Expression Assay Hs00174860_m1 (Invitrogen, USA). Množství transkriptů *GUS* bylo stanoveno soupravou Ipsogen BCR-ABL1 Mbc (GUS) Kit (Qiagen, SRN). Real-time PCR byla provedena v přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research, Austrálie). Teplotní podmínky zahrnovaly teploty při 50 °C po dobu 2 min a 95 °C 10 min. Následovalo 50 cyklů složených z 15s denaturace při 95 °C a 60s hybridizace a polymerace při 60 °C. Získaná data byla normalizována na počet transkriptů *GUS*; všechny vzorky byly vyšetřeny v dubletu.

Statistická analýza

Pro statistiku byly využity programy Statistica v.12 (StatSoft, ČR) a MedCalc (MedCalc Software, Belgie). Hodnocení významnosti změn mezi soubory dat bylo provedeno pomocí neparametrického Mann-Whitneova U testu. Za statisticky významné byly považovány změny při hodnotě $P < 0,05$.

Výsledky a diskuse

Syntézou a spojením všech navržených genových segmentů do jediného inzertu se zajistilo jejich ekvimolární zastoupení v připravených syntetických multikalibračních roztocích. Rovnocennost kalibračních bodů pro jakýkoliv sledovaný receptor, včetně genu *GUS*, byla patrná ze získaných kalibračních parametrů. V tab. I jsou pro každý kalibrační bod uvedeny počty cyklů PCR nezbytné k překonání meze detekce (CT, cycle threshold). Jako mez detekce byla pro všechny metody zvolena hodnota 0,05 fluorescenčních jednotek.

Tabulka I

Hodnoty CT zjištěné v kalibračních standardech

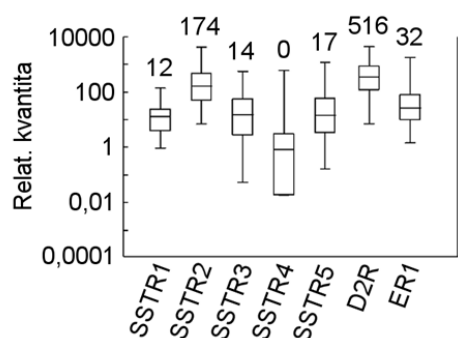
Gen	Počty kopií v kalibračním standardu				
	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$
<i>SSTR1</i>	19,4	22,6	26,1	29,5	33,0
<i>SSTR2</i>	20,4	23,6	26,9	30	33,8
<i>SSTR3</i>	17,6	20,7	23,9	27,3	31,1
<i>SSTR4</i>	18,6	21,9	25,3	28,7	32,2
<i>SSTR5</i>	18,4	21,9	25,4	28,8	32,5
<i>D2DR</i>	19,5	22,8	26,2	29,9	33,2
<i>ERI</i>	17,5	20,9	24,2	27,9	31,3
<i>GUS</i>	18,1	21,7	25,4	29,0	32,7

Z tab. I je patrné, že hodnoty CT se pro jednotlivé receptory nelišily o více než 2–3 reakční cykly. Tyto rozdíly byly způsobeny různou reakční kinetikou jednotlivých metod. Rozmezí směrnic kalibračních funkcí obecného tvaru $CT = \text{směrnice} \cdot \log(\text{koncentrace}) + \text{konstanta}$ bylo –3,38 až –3,53; účinnost reakcí kolísala mezi 1,9 a 2,0.

Vyšetření transkriptů *SSTR1–SSTR3*, *D2R* a *ER1* prokázalo jejich expresi ve všech 44 adenomech. Expres *SSTR5* byla potvrzena ve 34 případech (77 %) a *SSTR4* v 31 adenomu (70 %). Transkripty genu *GUS* byly ve vzorcích přítomny v množství od 1816 do 48 464 kopií (medián 12 812 kopií). Na obr. 2 jsou v logaritmickém znázornění vyneseny exprese všech sedmi studovaných receptorů. Hodnoty mediánů jsou uvedeny nad jednotlivými krabicovými grafy.

Nejvyšší počty transkriptů byly nalezeny v genech *SSTR2* a *D2R*, které se významně ($P < 0,001$) lišily od genů se středně vysokou expresí (*SSTR1*, *SSTR3*, *SSTR5* a *ER1*). Prokazatelně nejnižší expresi měl gen *SSTR4* ($P < 0,001$). Podobné výsledky získané s menšími počty vyšetřených osob byly publikovány již dříve^{14,15}. Hodnoty exprese *SSTR2* a *D2R* v našem souboru spolu vzájemně korelovaly ($r = 0,33$; $P < 0,026$).

Relativně vysoké exprese *SSTR2* umožňují použít k léčbě akromegalie somatostatinová analoga (oktreotid nebo lanreotid). Tato dlouhodobě působící léčiva snižují sekreci růstového hormonu u neoperabilních pacientů, usnadňují překlenutí období před nástupem účinku radioterapie, a jsou využívány také v předoperačním období. Úspěšnost této léčby bývá až 70 % a souvisí s mírou exprese *SSTR2* (cit.¹⁶). U rezistentních pacientů lze vzhledem k vysokým hladinám receptorů *D2R* použít v kombinaci dopaminové agonisty¹⁷. Léčbu je možno také kombinovat s radioterapií, a nově též s antagonistou růstového hormonu působícím na receptorech pro růstový hormon (pegvisomant).



Obr. 2. Expresní profil somatostatinových receptorů (*SSTR1–SSTR5*), dopaminového receptoru (*D2R*) a estrogenového receptoru (*ER1*)

Dosavadní studie nepotvrdily korelaci mezi imunochemicky stanovenými počty receptorů a množstvím transkriptů určených pomocí real-time PCR (cit.¹⁸). Vzájemný nesoulad výsledků obou metod může souviset s regulačními procesy ovlivňujícími posttranslačně počet receptorů, s heterodimerizací receptorů v membráně či internalizací receptorů do cytosolu buněk; vliv mohou mít různé sestřihové varianty mRNA a další faktory. Nejvhodnější metodický postup analýzy těchto receptorů bude možné vybrat až po zveřejnění výsledků dlouhodobějšího sledování většího počtu léčených osob. Tato data zatím nejsou k dispozici.

Závěr

Vytvořené multilokusové kalibrátory jsou nástrojem pro získání spolehlivých výsledků stanovení množství transkriptů somatostatinových, dopaminových a estrogenových receptorů. Určení jejich expresního profilu v odoperované tkáni může přispět k volbě správné strategie péče o pacienty s adenomy hypofýzy.

Tato studie byla finančně podpořena prostředky MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906), grantem SVV 260057/2014 a projektem PRVOUK P37/11 Univerzity Karlovy v Praze.

LITERATURA

- Ross D. M., Branford S., Seymour J. F., Schwarzer A. P., Arthur C., Bartley P. A., Slader C., Field C., Dang P., Filshie R. J., Mills A. K., Grigg A. P., Melo J. V., Hughes T. P.: *Leukemia* 24, 1719 (2010).
- Sesti G., Federici M., Lauro D., Sbraccia P., Lauro R.: *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17, 363 (2001).
- Tramm T., Hennig G., Kyndi M., Alsner J., Sørensen F. B., Myhre S., Sørlie T., Overgaard J.: *Virchows Arch.* 463, 775 (2013).
- Colao A., Pivonello R., Di Somma C., Savastano S., Grasso L. F., Lombardi G.: *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 10, 111 (2009).
- Hofland L. J., Feelders R. A., de Herder W. W., Lamberts S. W.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 326, 89 (2010).
- Visser-Wisselaar H. A., Van Uffelen C. J., Van Koetsveld P. M., Lichtenauer-Kaligis E. G., Waaijers A. M., Uitterlinden P., Mooy D. M., Lamberts S. W., Hofland L. J.: *Endocrinology* 138, 1180 (1997).
- Korner M., Waser B., Schonbrunn A., Perren A., Reubi J. C.: *Am. J. Surg. Pathol.* 36, 242 (2012).
- Nishioka H., Tamura K., Iida H., Kutsukake M., Endo A., Ikeda Y., Haraoka J.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 331, 73 (2011).
- Muscarella L. A., D'Alessandro V., la Torre A., Coppetti M., De Cata A., Parrella P., Sperandeo M., Pellegrini F., Frusciante V., Maiello E., Merla G., Fazio V. M., Vendemiale G.: *Cell. Oncol.* 34, 435 (2011).
- Hughes R. A., Miklos A. E., Ellington A. D.: *Methods Enzymol.* 498, 277 (2011).

11. Gibson D. G., Young L., Chuang R. Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O.: *Nat. Methods* 6, 343 (2009).
12. Beránek M., Drastíková M., Sirák I., Paulíková S., Vošmik M., Petera J.: *Chem. Listy* 107, 880 (2013).
13. O'Toole D., Saveanu A., Couvelard A., Gunz G., Enjalbert A., Jaquet P., Ruzniewski P., Barlier A.: *Eur. J. Endocrinol.* 155, 849 (2006).
14. Taboada G. F., Luque R. M., Bastos W., Guimaraes R. F., Marcondes J. B., Chimelli L. M., Fontes R., Mata P. J., Filho P. N., Carvalho D. P., Kineman R. D., Gadelha M. R.: *Eur. J. Endocrinol.* 156, 65 (2007).
15. Nielsen S., Møller S., Rasmussen L. M., Ledet T., Olsen N., Bojsen-Møller M., Astrup J., Weeke J., Jørgensen J. O.: *J. Endocrinol. Invest.* 24, 430 (2001).
16. Colao A., Auriemma R. S., Lombardi G., Pivonello R.: *Endocr. Rev.* 32, 247 (2011).
17. Colao A.: *Endokrynol. Pol.* 58, 356 (2007).
18. Gonzalez B., Vargas G., Ramirez C., Asa S., Cheng S., Sandoval C., Mercado M.: *Endocrinol. Nutr.* 61, 523 (2014).

M. Beránek^{a,b}, M. Drastíková^a, F. Gabalec^c, V. Palička^a, and J. Čáp^c (^a *Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital, Hradec Králové*, ^b *Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Charles University in Prague*, ^c *Department of Internal Medicine 4, Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital, Hradec Králové*): **A Synthetic Multilocus Calibrator for Analysis of Gene Expression in Pituitary Tumors Causing Acromegaly**

The aim of the study was to propose a multilocus calibrator containing seven specific sequences of *SSTR1-SSTR5*, *D2R*, *ER1* genes and the *GUS* house-keeping reference gene. For preparation, gene synthesis and gene assembly technique were used. The experimental group consisted of 44 pituitary adenomas with overproduction of growth hormone leading to acromegaly. The gene expression was investigated using the real-time PCR. We revealed highest numbers of *SSTR2* and *D2R* transcripts, lower numbers of *SSTR1*, *SSTR3*, *SSTR5* and *ER1* transcripts, and the lowest transcription of the *SSTR4* gene. The use of the multicalibrator ensured a high comparability of the results obtained for the tested genes.

6.4 Statistická analýza

Data jsou popsána jako absolutní a relativní četnosti kategorických proměnných a medián (5. — 95. percentil) pro kvantitativní proměnné. Pro zhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Mann-Whitney rank sum test. Porovnání bylo provedeno i s použitím Kruskal-Wallisovy analýzy rozptylů (Dunnova metoda). Hodnoty P menší než 0,05 jsou považovány za statisticky významné. Použito bylo programu SigmaStat verze 3.5 (Systat Software, San Jose, California).

Pro kvantitativní analýzu proteinů získaných LC-MS analýzou byl použit software “R” (R Foundation for Statistical Computing, Rakousko) s rozšířením Bioconductor pro bioinformatické analýzy. Výběr proteinů pro následné statistické vyhodnocení byl proveden pomocí následujících kritérií – protein byl kvantifikován alespoň ve dvou ze tří replikátů a měl CV kvantifikace menší než 20%.

7 Výsledky

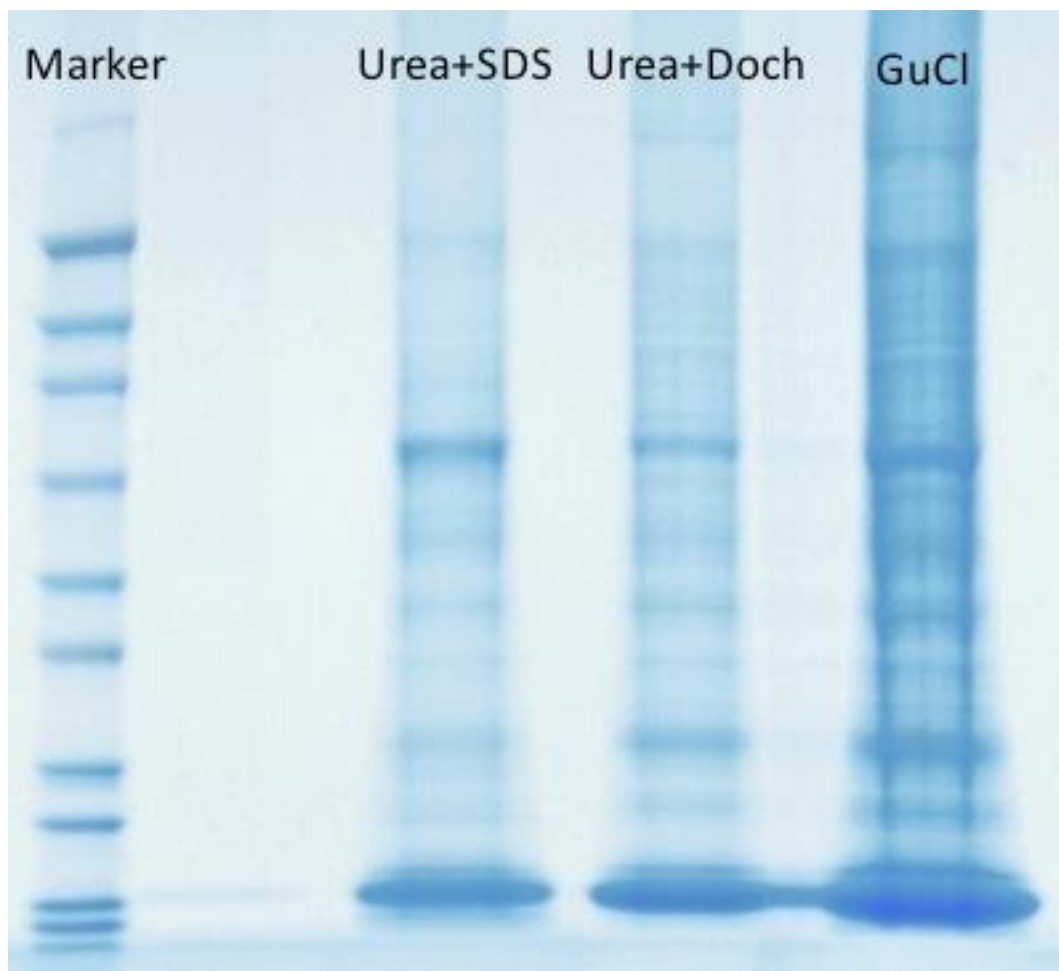
7.1 Proteomická analýza

7.1.1 Zavedení postupu pro zpracování vzorků tkáně

V minulosti byl naší skupinou využíván pufr *RNAlater*® pro skladování vzorků určených pro transkriptomickou analýzu. S tímto pufrem jsme měli velmi dobré zkušenosti a bylo tedy nutné ověřit, zda bude kompatibilní i s proteomickými metodami.

Kousky zmražené mozkové tkáně byly opláchnuty ve fyziologickém roztoku a homogenizovány pomocí homogenizátoru (IKA, Německo) na kompaktní pastu, která byla dále ředěna do různých lyzačních pufrů. Abychom získali co nejširší přehled, zařadili jsme všechny v proteomice běžně používané pufrы – 5% deoxycholát sodný (DOCH), 5% dodecylsulfát sodný (SDS), 8M guanidine hydrochlorid (GuCl), 8M močovina (UREA), 5% DOCH v 8M močovině a 5% SDS v 8M močovině. Do 400 μ l pufru bylo přeneseno 30 mg pasty a suspenze byla inkubována 2h při 8°C. Nezlyzované zbytky vzorků byly stočeny a koncentrace proteinů v supernatantu byla určena pomocí metody kvantifikace celkového extrahovaného proteinu metodou Bicinchoninic acid assay (BCA). Pro další testování byl vybrán pufr složený z 5% deoxycholátu sodného, což je nejen výborné lyzační činidlo a dobrý solubilizátor špatně rozpustných proteinů, ale také výrazně potencuje aktivitu trypsinu při enzymatickém štěpení. Navíc se dá ze vzorku před vlastní LC-MS analýzou velmi jednoduše odstranit.

Byla také provedena analýza proteinového složení získaných extraktů pomocí jednorozměrné gelové elektroforézy s následnou detekcí pomocí barvení proteinů metodou Coomassie blue. Snímek gelu na Obrázek 1. naznačuje, že vzorky jsou z kvalitativního hlediska porovnatelné, což znamená, že jednotlivé metody extrakce poskytují podobné proteinové složení, nicméně z kvantitativního hlediska vychází nejlépe metoda lýzy pomocí guanidin hydrochloridu, což potvrzuje výsledky získané metodou BCA.



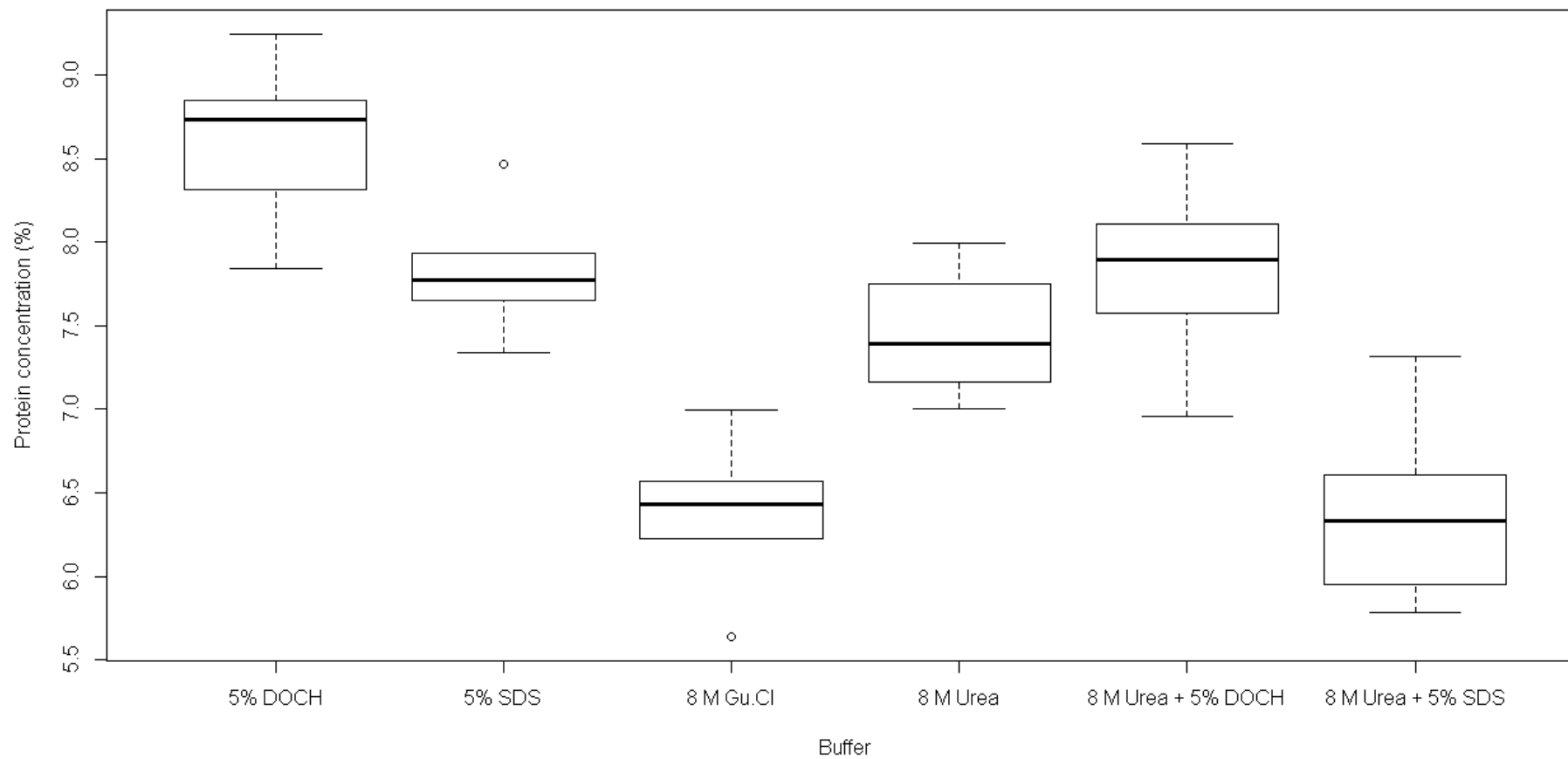
Obrázek 1 Jednorozměrná gelová analýza porovnávající různá složení lyzačních pufrů – Urea+SDS: Močovina + dodecylsulfát sodný; Urea+Doch: Močovina + deoxycholát sodný; GuCl: guanidium hydrochlorid.

Dle výsledků BCA i gelové analýzy poskytuje nejlepší výtěžek pufr obsahující guanidium hydrochlorid. Z hlediska proteomické analýzy je však množství materiálu získané kteroukoliv lyzační metodou zcela dostatečné pro následné kroky. Dále ze získaných výsledků vyplývá, že komponenty pufru RNeasy, používaného pro uchovávání vzorků, neinterferují s kvantitativní ani gelovou analýzou a bude jej tedy možné použít i pro další kroky proteomické analýzy.

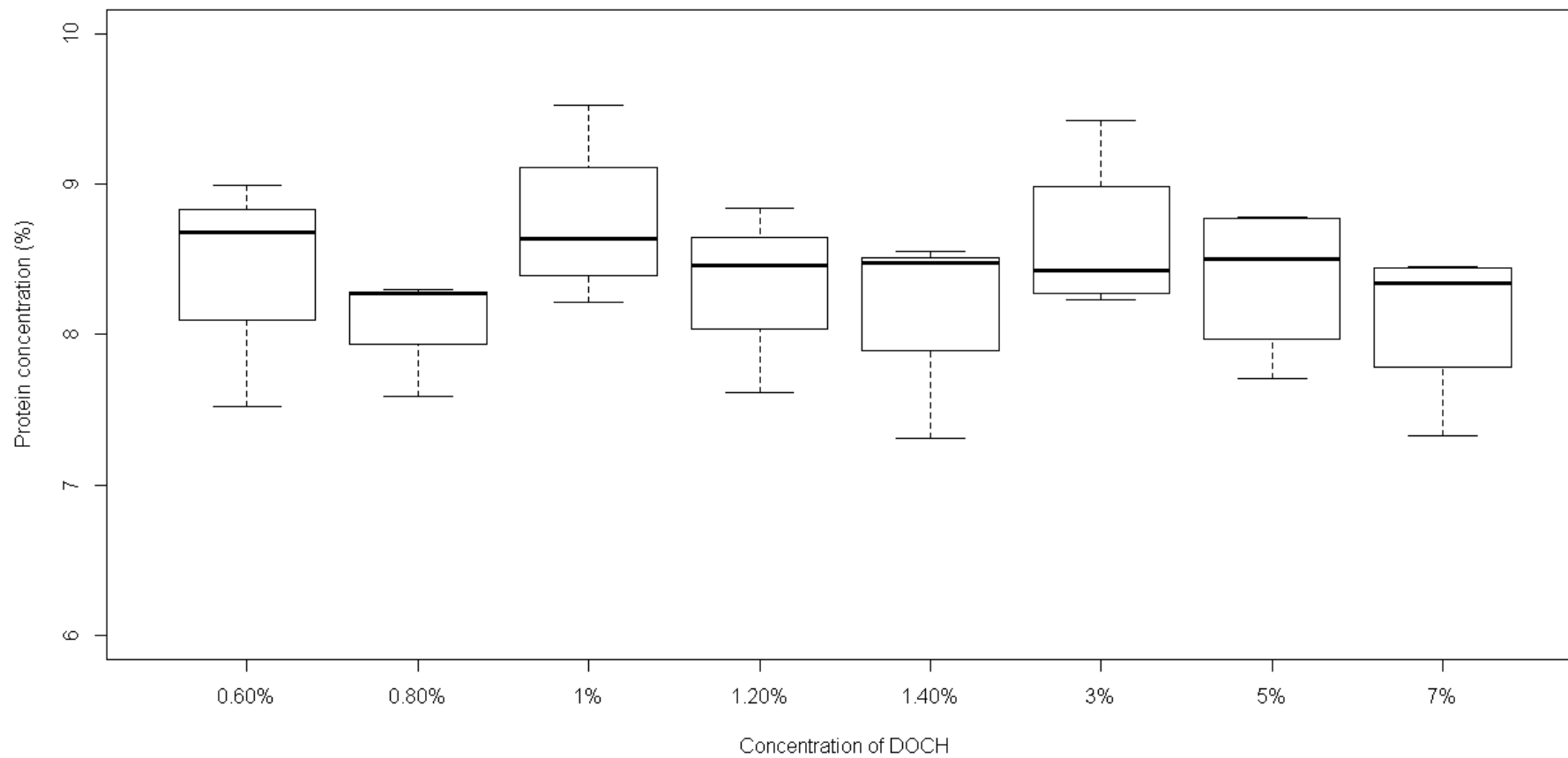
Pro zjištění optimální koncentrace jsme dále provedli experiment s různými koncentracemi deoxycholátu sodného v rozmezí 0,6–8% roztoku (Obrázek 3). Výsledky jednotlivých koncentrací byly prakticky shodné, a tudíž jsme jako finální zvolili 3% roztok z důvodů nejlepší stability lyzátu během skladování při -20°C oproti nižším koncentracím. Vyšší koncentrace pak nepřinášely žádný užitek.

Ze získaných výsledků také vyplývá, že komponenty pufru *RNAlater*[®], používaného pro uchování vzorků, neinterferují s kvantitativní ani gelovou analýzou, a je ho tedy možné použít i pro další kroky proteomické analýzy.

Obrázek 2 Vliv složení lyzačního pufru na celkový výtěžek proteinů: Na základě získaných výsledků poskytuje nejlepší výtěžnost pufr obsahující 5% deoxycholát sodný.



Obrázek 3 Vliv koncentrace lyzačního pufru na celkový výtěžek proteinů. Vzhledem k zanedbatelným rozdílům byl jako finální pufr zvolen 3% roztok z důvodu nejlepší stability lyzátu při skladování při -20°C.



7.1.2 „průzkumná“ LC-MS analýza

V testovacím vzorku bylo v průměru identifikováno 897 proteinů (± 6) pomocí 3722 peptidů (± 45). Pokrytí v řádu stovek proteinů bylo vyhodnoceno jako velmi dobré.

7.1.3 Pilotní komparativní analýza vzorků od pacientů s progresí a bez progresu růstu adenomu.

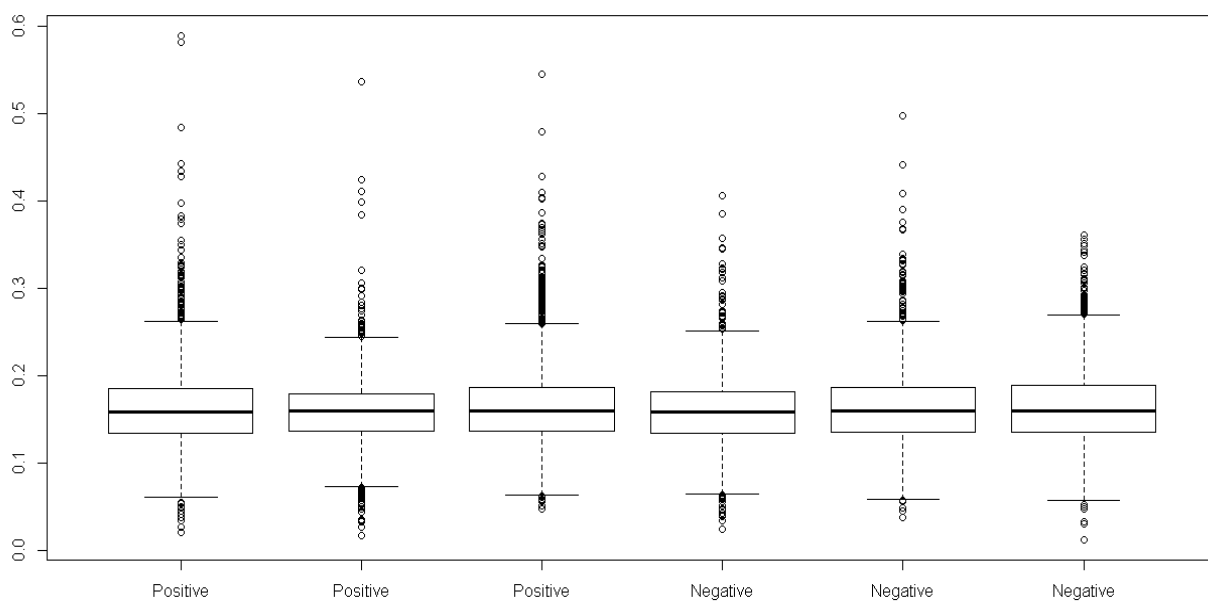
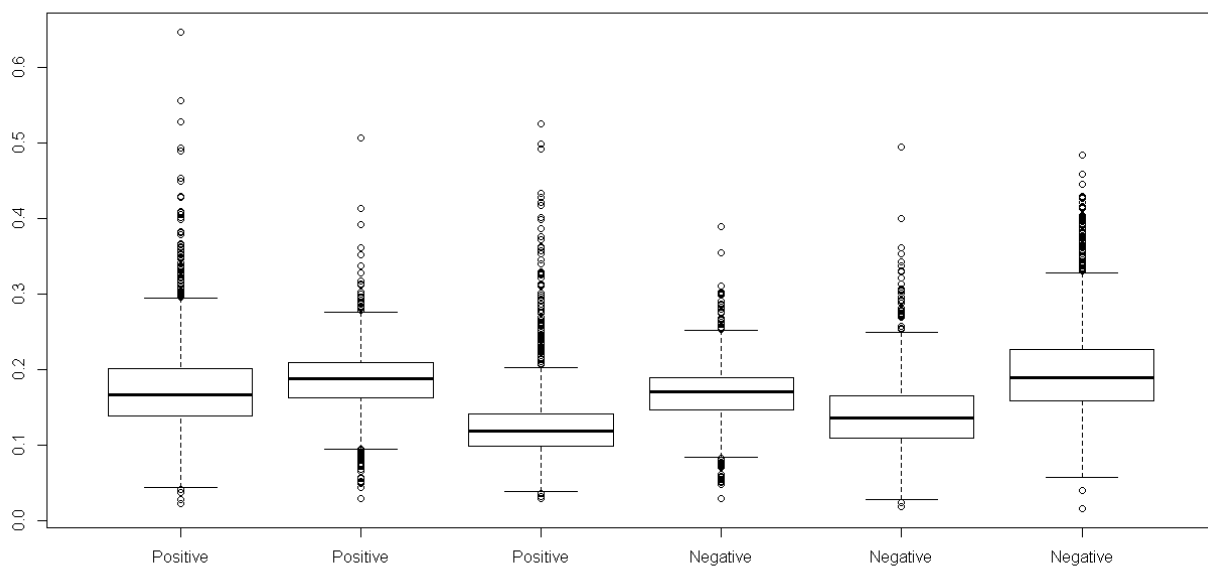
Pomocí „průzkumné“ LC-MS analýzy bylo zjištěno dostatečné pokrytí proteomu a proto jsme přistoupili ke komparativní analýze vzorků. Do porovnání bylo zahrnuto celkem 6 pacientů, 3 s progresí či růstem residua a 3 nemocní bez progresu, všichni operovaní na Neurochirurgické klinice FN Hradec Králové v letech 2011-2012.

Indikací k první operaci byla vždy porucha zraku ve smyslu bitemporální hemianopsie. Šlo ve všech případech dle MR o makroadenomy v největším rozměru o velikosti 15 – 32 mm (průměr 25 mm). Charakteristiky nemocných jsou uvedeny v níže uvedené v tabulce. Viz. Tabulka 5.

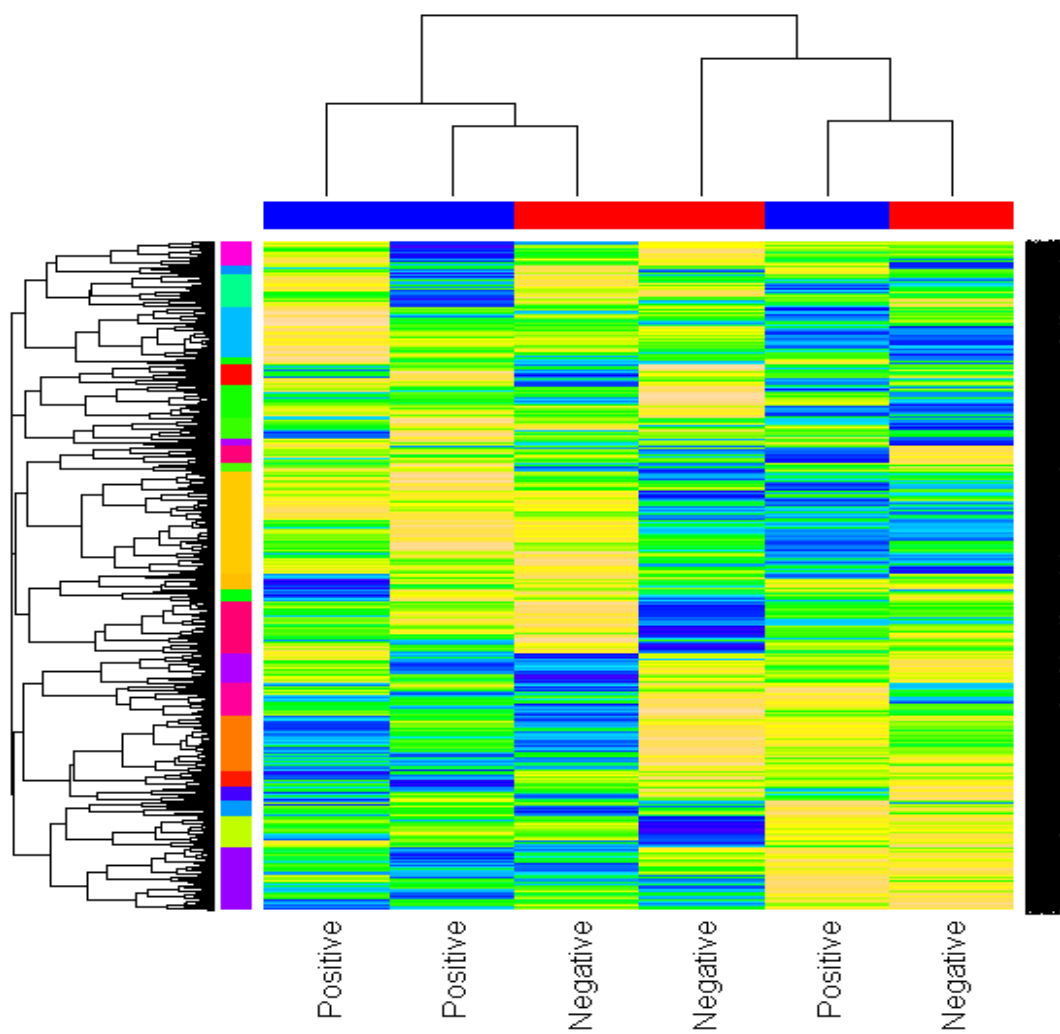
V průměru bylo identifikováno 3279 proteinů (± 56) pomocí 19 590 peptidů (± 266). Výběr proteinů pro následné statistické vyhodnocení byl proveden pomocí následujících kritérií – protein byl kvantifikován alespoň ve dvou ze tří replikátů a měl CV kvantifikace menší než 20 %. Celkem tak bylo do statistického vyhodnocení zařazeno 1730 proteinů. Kvantitativní data byla nejprve normalizována pomocí algoritmu Loess (Obrázek 4) a následně byla provedena klastrovací analýza pomocí všech proteinů jako vstupu (Obrázek 5).

Tabulka 5 Charakteristika souboru pro proteomickou analýzu

	Charakteristika porovnávaného souboru					
	S recidivou/růstem			Bez recidivy		
N°	1	2	3	4	5	6
Pohlaví	muž	žena	žena	žena	muž	žena
Věk v době dg.	40	62	31	77	68	15
Imunohistochemie						
gonadotropní	-	+	+	ND	ND	ND
plurihormonální	+	-	-	ND	ND	ND
Ki67 (%)	1	1	3	ND	ND	ND
Velikost v největším rozměru	26	26	27	32	26	15
Hemianopsie/poruchy visu	+	-	+	+	+	+
Deficit gonadotropinů	-	+	+	+	-	-
Deficit v tyroidální ose	-		+	+	-	-
Panhypopituitarismus	-	-	-	+	-	-
Propagace ze sedla						
suprasellárně	+	-	+	+	+	+
parasellárně	-	+	+	-	-	-
sinus cavernosus	+	-	-	+	+	-
Primární indikace k operaci						
bitemporální hemianopsie	+	-	+	+	+	-
cefalea	-	-	-	-	+	-
grafická progrese	-	+	-	-	-	-
diplopie	-	-	-	-	-	+



Obrázek 4 Kvantitativní distribuce proteinů v jednotlivých vzorcích před (nahore) a po Loess normalizaci (dole).



Obrázek 5 Klastrovací analýza za použití všech proteinů jako vstupu. Proteiny jsou zobrazeny na svislé ose, jednotliví pacienti pak na ose vodorovné.

Tabulka 6 Rozdílně exprimované peptidy, po spojení replikátu A a B.

UniProt#	Protein	Gene	Sekvence	Fold Change Pos vs Neg (A)	P-value (A)	Adjusted P-value (A)	Fold Change Pos vs Neg (B)	P-value (B)	Adjusted P-value (B)	Average of Fold Change
P16949	Stathmin STMN1_HUMAN	STMN1	ASGQAFELILSPR	0,51446	0,02066	0,99996	0,64634	0,03391	0,99971	0,58040
P02671	Fibrogen alpha chain FIBA_HUMAN	FGA	DYEDQGK	3,08524	0,04135	0,99996	2,43310	0,03388	0,99971	2,75942
Q92563	Testican-2 TICN2_HUMAN	SPOCK2	EKPPCLAELER	0,42212	0,00558	0,99996	0,37372	0,00485	0,99971	0,39792
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 UCHL1_HUMAN	UCHL1	FSAVALCK	0,58361	0,01858	0,99996	0,56602	0,03064	0,99971	0,57481
P02671	Fibrogen alpha chain FIBA_HUMAN	FGA	GDFSSANNR	2,50416	0,01100	0,99996	2,90762	0,01397	0,99971	2,70589
P02675	Fibrinogen beta chain FIBB_HUMAN	FGB	GGETSEMYLIQPDSSVKPYR	2,16386	0,00539	0,99996	2,42976	0,00782	0,99971	2,29681
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C ALDOC_HUMAN	ALDOC	GILAADES VGSMK	1,96136	0,02941	0,99996	1,72318	0,03123	0,99971	1,84227
P02671	Fibrogen alpha chain FIBA_HUMAN	FGA	GLIDEVNQDFTNR	2,06822	0,02458	0,99996	2,11381	0,04276	0,99971	2,09102
P10645	Chromogranin-A CMGA_HUMAN	CHGA	GLSAEPGWQAK	0,39092	0,00728	0,99996	0,43913	0,01686	0,99971	0,41503
P02671	Fibrogen alpha chain FIBA_HUMAN	FGA	HQSACK	2,27656	0,03067	0,99996	2,74209	0,01678	0,99971	2,50933
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 UCHL1_HUMAN	UCHL1	KQIEELK	0,55101	0,01922	0,99996	0,52583	0,01437	0,99971	0,53842
P02675	Fibrinogen beta chain FIBB_HUMAN	FGB	LESDVSAQMEYCR	1,84785	0,02653	0,99996	1,86677	0,04299	0,99971	1,85731
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 UCHL1_HUMAN	UCHL1	LG FEDGSVLK	0,65109	0,04794	0,99996	0,64097	0,03658	0,99971	0,64603
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 UCHL1_HUMAN	UCHL1	LG VAGQWR	0,63352	0,02257	0,99996	0,62513	0,02792	0,99971	0,62932
P13521	Secretogranin-2 SCG2_HUMAN	SCG2	LTGPNNQK	0,38163	0,04011	0,99996	0,32473	0,02813	0,99971	0,35318
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 UCHL1_HUMAN	UCHL1	QFLSETEK	0,62857	0,03044	0,99996	0,54155	0,01657	0,99971	0,58506
Q9NRX4	14 kDa phosphohistidine phosphatase PHP14_HUMAN	PHPT1	QGCDCECLGGR	0,55898	0,03001	0,99996	0,61622	0,04580	0,99971	0,58760

P20962	Parathyrosin PTMS_HUMAN	PTMS	RAAEEEEDEADPK	0,29960	0,03050	0,99996	0,31763	0,02821	0,99971	0,30862
P35080	Profilin-2 PROF2_HUMAN	PFN2	SQGGPEPTYNVAVGR	0,65420	0,04065	0,99996	0,54989	0,01675	0,99971	0,60205
Q9BW30	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 TPPP3_HUMAN	TPPP3	SVTGTDVDIVFSK	0,57750	0,02696	0,99996	0,56943	0,01576	0,99971	0,57347
P14618	Pyruvate kinase PKM KPYM_HUMAN	PKM	TATESFASDPILYRPVAVALDTK	0,63332	0,04521	0,99996	0,59264	0,04712	0,99971	0,61298
P09211	Glutathione S-transferase P GSTP1_HUMAN	GSTP1	TLGLYGK	0,54374	0,04828	0,99996	0,50484	0,04021	0,99971	0,52429
O94760	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 DDAH1_HUMAN	DDAH1	TPEEYPESAK	0,49403	0,01975	0,99996	0,61311	0,04336	0,99971	0,55357
P27348	14-3-3 protein theta 1433T_HUMAN	YWHAQ	YLAEVACGDDRK	0,58282	0,03694	0,99996	0,63130	0,04323	0,99971	0,60706

Na této úrovni nebyl klastrovací algoritmus schopen správně seskupit všechny pacienty v pozitivní respektive negativní skupině. Přistoupili jsme tedy k dalšímu kroku, ve kterém jsme vyhodnotili kvantitativní změny ve všech 1 730 proteinech zahrnutých do statistického vyhodnocení. Z této relativně velké množiny proteinů splňovaly pouze 3 kritérium pro statisticky signifikantní změnu mezi studovanými skupinami ($p \leq 0.05$). Těmto třem proteinům jsme tedy věnovali bližší pozornost v dalších krocích vyhodnocení.

Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCH-L1; P09936)

Alpha-internexin (Q16352)

Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (TPPP3; Q98W30)

Rozdílně exprimované peptidy a proteiny, změna v pozitivní vs. negativní skupině a odpovídající p hodnoty jsou shrnuty v Tabulka 6 a Tabulka 7. Alpha-internexin byl více exprimován ve skupině s agresivnějším chováním. UCH-L1 a TPPP3 byly v této skupině naopak exprimovány méně.

Tabulka 7 Dysregulované proteiny mezi studovanými skupinami pacientů

UniProt#	Protein	Pos vs. Neg	p
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	0.6532452	0.024
Q16352	Alpha-internexin	2.6770046	0.049
Q9BW30	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	0.689304	0.042

7.2 Korelace dysregulovaných proteinů a receptorů s imunohistochemickým vyšetřením u adenomů hypofýzy

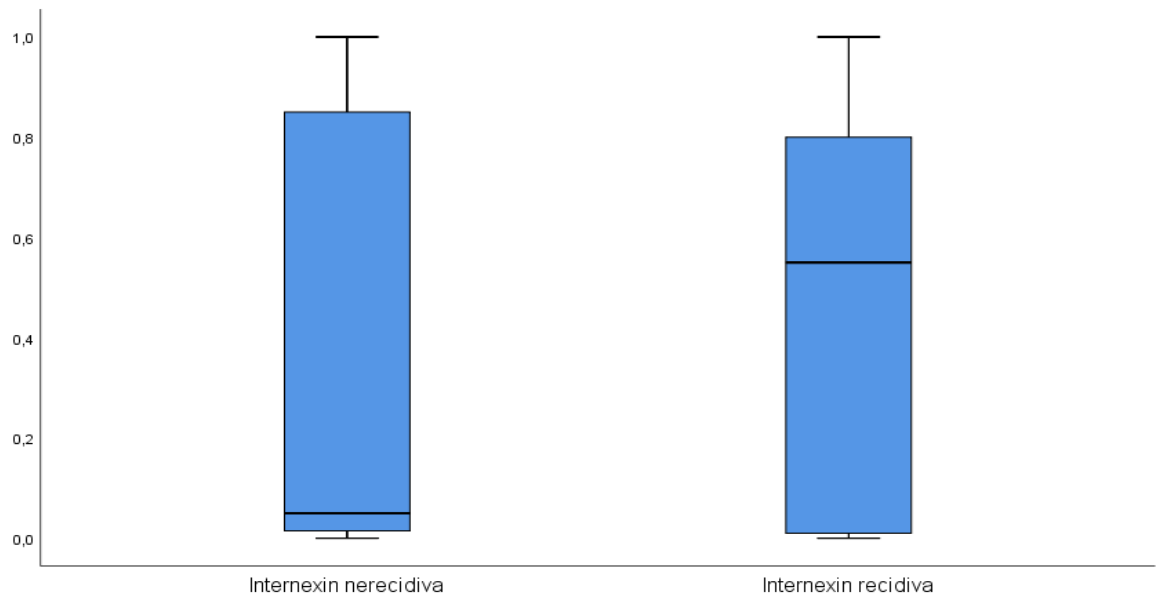
Do porovnání byli zařazeni nemocní s klinicky afunkčními adenomy. Charakteristika souboru viz. Tabulka 8. V souboru je zahrnuto 6 nemocných analyzovaných v kapitole 7.1.

Tabulka 8 Charakteristika porovnávaných skupin nemocných

	<u>S recidivou/růstem</u>	<u>Bez recidivy</u>
N°	11	15
Pohlaví (ženy/muži)	5/6	10/5
Věk v době dg.	56 (31-70)	57 (15-87)
Imunohistochemie		
gonadotropní	5	9
plurihormonální	2	0
null-cell	0	1
tichý kortikotropní	2	2
Ki67 (%) (průměr)	1,11 (0-3)	1,27 (0-3)
Velikost v největším rozměru (med)	21 (10-37)	20 (13-37)
Hemianopsie/poruchy visu	9	10
Deficit gonadotropinů	3	1
Deficit v tyroidální ose	1	1
Panhypopituitarismus	0	2
Propagace ze sedla		
suprasellárně	9	12
parasellárně	2	1
sinus cavernosus	4	4
Primární indikace k operaci		
bitemporální hemianopsie	5	14
cefalea	0	1
grafická progrese	6	0
diplopie	0	1

V tomto souboru byla exprese TPPP3 negativní (0) ve všech případech. Exprese alpha-interneksinu byla negativní v případě nerecidivující skupiny nemocných, pozitivita u skupiny hodnocené jako recidivující (medián procentuální exprese 5 vs 55). Rozdíl však nebyl statisticky významný ($P = 0,801$). Ubiquitin byl silně exprimován u obou skupin nemocných (3 – procentuálně 90 vs 100 u nerecidivující a recidivující skupiny). Při srovnání s předchozí proteomickou analýzou se nepotvrdil statisticky významný rozdíl v expresi proteinů mezi

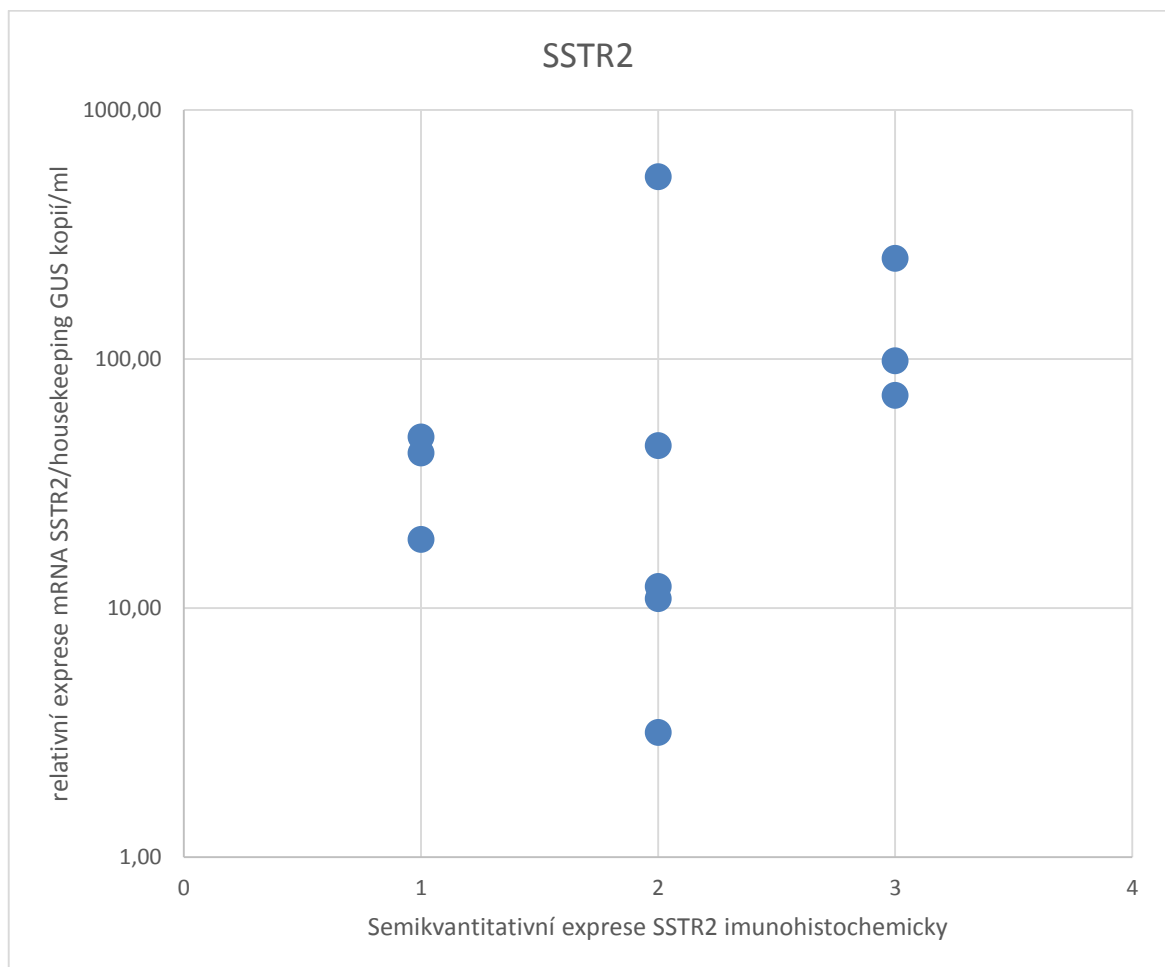
skupinou recidivujících a nerecidivujících klinicky afunkčních adenomů. Nesignifikantní rozdíl s vyšší expresí u recidivujících tumorů byl pozorován jen v případě alpha-internexinu. Viz. Graf 1.



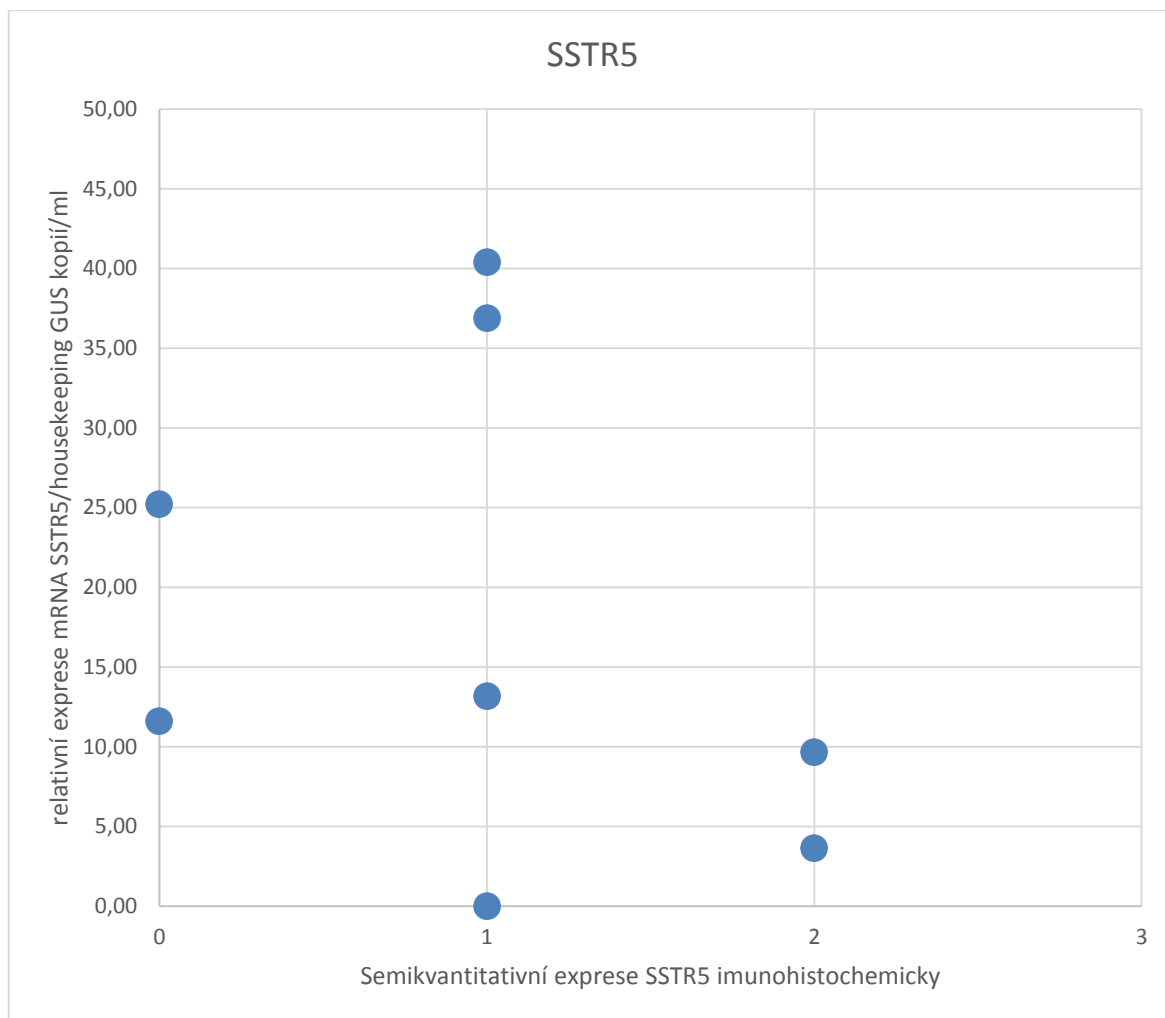
Graf 1 Porovnání mediánu exprese alpha-internexinu u recidivujících a nerecidivujících klinicky afunkčních adenomů. Rozdíl nebyl statisticky významný.

7.3 Korelace exprese somatostatinových receptorů a dopaminového receptoru 2 typu mezi imunohistochemií a real-time PCR

Expres somatostatinového receptoru 2 (SSTR2) a 5 (SSTR5) byla stanovena u celkem 15 nemocných s klinicky potvrzenou akromegalií (4 ženy, 11 mužů) ve věku $50,6 \pm 12,9$ let (26 až 68). Expres somatostatinových receptorů byla nerovnoměrná s mediánem relativní exprese pro SSTR2 46,8 a SSTR5 10,6. Imunohistochemicky byla exprese SSTR2 přítomna v 14 případech, v 1 případě bylo stanovení neúspěšné pro špatnou kvalitu vzorku. Semikvantitativní zhodnocení prokázalo přítomnost SSTR 2 1+ v 4 případech, 2+ v 6 případech a 3+ v 4 případech. Expres SSTR5 pak byla 0+ v 1 případě, 1+ v 8 případech, a 2+ v 3 případech. Při porovnání semikvantitativního zhodnocení exprese a relativní exprese mRNA nebyla nalezena vzájemná shoda mezi vyšetřeními. Viz. Graf 2 a Graf 3.



Graf 2 Korelace mezi relativní kvantitou mRNA SSTR2/housekeeping GUS v počtu kopií/ml a imunohistochemického (ICC) skóre



Graf 3 Korelace mezi relativní kvantitou mRNA SSTR5/housekeeping GUS v počtu kopií/ml a imunohistochemického (ICC) skóre

8 Diskuze

Tumory hypofýzy jsou jedny z nejčastějších intrakraniálních tumorů v populaci. Některé tumory jsou považovány za agresivní s ohledem na jejich rezistenci ke konvenční léčbě nebo recidivu během sledování po léčbě. Do dnešního dne nebyl objeven marker, který by pomohl predikovat růst/agresivitu klinicky afunkčních adenomů. Bylo sice navrženo mnoho různých prognostických markerů, jejich efektivnost však nebyla vždy potvrzena, jak shrnuje ve své práci Raverot.¹⁶⁷ Recentně publikovaná přehledná práce shrnuje dosavadní výzkum na tomto poli i s ohledem na ostatní potencionální zkoumané biomarkery.¹⁶⁸ Ve snaze o jejich nalezení jsme se rozhodli k využití moderních proteomických přístupů. V ČR dosud nebyl takovýto postup pro studium klinicky afunkčních adenomů aplikován a studie provedené v zahraničí měly své limity, viz kapitola 3.5.3. Po zavedení a optimalizaci metody jsme provedli komparativní analýzu. Při ní jsme zjistili signifikantní rozdíl v expresi 16 peptidů a zejména 3 proteinů.¹⁶⁹

Prvním z proteinů je Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 [UCH-L1; přístupový kód P09936 v databázi UniProt <http://www.uniprot.org/>]. Jedná se o enzym zahrnutý v procesu přeměny ubiquitinových prekurzorů a proteinů. Pro upřesnění, ubiquitin, je protein o 76 aminokyselinách, který může být konjugován s rezidui v cílovém proteinu. Tato konjugace mění funkci a/nebo osud cílového proteinu. Celý ubiquitinový systém je centrem pro regulaci téměř všech buněčných procesů, protože kontroluje aktivitu proteinů a jejich počet. Mimo degradaci proteinu může ubiquitinový systém hrát roli ve velkém množství dalších buněčných procesů, od přestupu cílových proteinů membránou, endocytóze až po reparaci DNA.¹⁷⁰ V neuronech má ubiquitinový systém roli ve vývoji, funkci a patologických procesech.¹⁷¹ Jak je ubiquitinový systém sám regulován, nevíme.¹⁷² Ubiquitin je odstraněn z cílového proteinu pomocí deubiquitináz (DUB). V lidském genomu je přibližně 90 DUB. Jedna z podskupin zahrnuje 4 hydrolázy C konce ubiquitinu (ubiquitin C-terminal hydrolase – UCH). Konkrétně UCH-L1, UCH-L3, UCH-L5 a BAP1. UCH jsou zahrnuty v různých nitrobuněčných dějích. UCH-L1 funguje jako proteáza hydrolyzující peptid na C glycinovém konci ubiquitinu. Také váže volný monoubiquitin a může zabránit jeho degradaci v lysozomech. Homodimer může mít ATP-independentní ligázovou aktivitu. Vyskytuje se v tělech nervových buněk a je zahrnut do procesů buněk neocortexu. Rovněž je znám jeho výskyt v neuronech a buňkách neuroendokrinního systému a tumorů z něj vycházejících. Je známa jeho down-regulace u nemocných s Parkinsonovou a

Alzheimerovou nemocí.^{173, 174} UCH-L1 konkrétně obsahuje 223 aminokyselin a jeho přesná funkce je aktuálně neznáma. Hojně se vyskytuje v neuronech, varlatech a ováriích. Dvě přirozeně se vyskytující myší linie s mutací *Uchl1* a *Uchl1* knock-outované myši mají shodný fenotyp a ukazují významnou roli UCH-L1 v udržení zdravého stavu a stability axonů.^{175, 176} Jedna z hypotéz je, že UCH-L1 hraje roli v odpovědi buňky v boji o přežití nebo může mít přímý efekt na progresi onemocnění. U skupiny námi hodnocené jako „agresivnější“ byla exprese UCH-L1 signifikantně nižší ($p = 0,024$).

Dalším zjištěným proteinem je Alpha-internexin (Q16352) (INA). Jde o neuronální střední filamentum IV třídy. Tento protein může tvořit nezávislou strukturální síť bez potřeby ostatních neurofilament. Jeho exprese je známa hlavně z dospělého centrálního nervového systému.¹⁷⁷ Samotná střední filamenta jsou strukturální proteiny poskytující mechanickou odolnost buňkám. Jsou specifické pro různé tkáně a mohou tedy být použita jako histopatologické markery. INA je zahrnut v procesech morfogeneze neuronů. Může tvořit strukturální síť sám o sobě nebo ve spolupráci s ostatními neurofilamenty (NF-L, NF-M, NF-H – klasifikovány podle své molekulární hmotnosti). Jde o první střední filamentum exprimované ve vyvíjejících se neuroblastech a malých neuronech. Doposud byl INA navržen jako potencionální diagnostický a prognostický marker gliomů, oligodendroglálních tumorů a neuroblastomů.¹⁷⁸⁻¹⁸² Data o expresi INA v hypofýze nejsou téměř žádná. Ve velmi recentní publikaci Schult et al. uvádí, že INA je jen velmi lehce exprimován v normální adenohipofýze a velké skupině hormonálně aktivních tumorů, ale klinicky afunkční adenomy (gonadotropinomy a null-cell adenomy) v jejich práci vykazovaly pozitivní a charakteristické barvení.¹⁸³ Recentně byla provedena proteomická analýza a následná verifikace exprese rozdílně exprimovaných proteinů imunohistochemicky a pomocí Western blotu u velké skupiny pankreatických neuroendokrinních tumorů. Alpha-internexin byl exprimován u poloviny tumorů a snížená exprese byla spojena s pokročilejším stádiem, metastázami a rekurencí a celkově nižším přežitím.¹⁸⁴ Ve spojení s hojně exprimovaným UCH-L1 tvořil alpha-internexin nezávislý marker lepšího přežití a přežití bez nemoci (disease free survival).¹⁸⁵

Třetím rozdílně exprimovaným proteinem je Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 TPPP3 (Q98W30), který má v lidském těle širokou expresi, ale jeho role stále není přesně určena. Dynamika mikrotubulů je modulována několika přídatnými proteiny, které se nazývají proteiny spojené s mikrotubuly (mikrotubule-associated proteins – MAP). Většina z nich spouští polymerizaci tubulinu nebo stabilizaci mikrotubulů. Skupina

proteinů spouštějících polymerizaci tubulinu (Tubulin polymerization promoting proteins TPPP) byla objevena nedávno. Zahrnuje TPPP1, 2 a 3. Tyto proteiny vykazují funkce podobné MAP a stabilizují mikrotubulární síť. TPPP3 byl zjištěn poprvé v hypotalamo-hypofyzární-adrenální ose.¹⁸⁶ TPPP3 je specifickým markerem vyvíjejícího se muskuloskeletálního systému přes indukci polymerizace tubulinu. Jeho Deplece TPPP3 inhibuje proliferaci, indukuje apoptózu HeLa buněk a potlačuje růst tumoru a metastázy.^{187, 188} Jeho exprese je zvýšena u nemalobuněčných nádorů plic a byla pozitivně spojena s velikostí tumoru, metastázami do uzlin, klinickým stádiem a horším přežitím. – nádoru plic. Ve stejné studii vyřazení (knockdown) TPPP3 významně indikoval apoptózu a zastavil buněčný cyklus in vitro a pozastavil růst i in vivo u xenograftů H1299 buněk.¹⁸⁹ TPPP3 by mohl být cílem pro protinádorovou terapii. Podobná data existují pro kolorektální karcinom.¹⁹⁰

V době projektu nebyl samotný UCHL1 či filamenta dosud u KAA analyzovány. Významným úskalím provedené finančně náročné analýzy je počet vzorků. Problematická je i definice agresivních tumorů. Jednoznačná histopatologická definice není a opírá se o klinické hodnocení. Rovněž současná definice agresivity tumoru neumožňuje použití preventivní léčby. Jsme si vědomi krátké doby sledování nemocných bez recidivy. Je známo, že KAA nejčastěji recidivují 5 až 10 let od operace.

Ve snaze potvrdit rozdílnou expresi tří proteinů jsme se rozhodli o provedení imunohistochemického vyšetření na větším souboru. Výhodou imunohistochemického vyšetření je přímé vyšetření vzorku tumoru, odpadá úskalí, které s sebou přináší metody jako RT-PCR a proteomika. V tomto souboru byla exprese TPPP3 negativní (0) ve všech případech. Ubiquitin byl silně exprimován u obou skupin nemocných (3 – procentuálně 90 vs 100 u nerecidivující a recidivující skupiny). Rozdíl jsme tedy nepotvrdili. Exprese alpha-internexinu byla negativní v případě nerecidivující skupiny nemocných, pozitivita u skupiny hodnocené jako recidivující (medián procentuální exprese 5 vs 55 respektive). Rozdíl však nebyl významný ($P = 0,801$). Tento nálezn je v diskrepanci s možnou rolí alpha-internexinu jako markeru progresu u pankreatických tumorů, jak bylo zmíněno výše. Rozdíl může být dán nejen velikostí souboru, ale zejména obtížnou charakteristikou agresivně se chovající skupiny. Při srovnání s naší předchozí proteomickou analýzou se nepotvrdil statisticky významný rozdíl v expresi proteinů mezi skupinou recidivujících a nerecidivujících klinicky afunkčních adenomů. Nesignifikantní rozdíl s vyšší expresí u recidivujících tumorů byl pozorován jen v případě alpha-internexinu. Tento rozdíl může být dán jednak malou

velikostí souboru, ale i způsobem odběru materiálu pro proteomickou analýzu. Úskalí s sebou nese rovněž retrospektivní charakter studie. Imunohistochemické vyšetření tedy nefungovalo u dvou ze tří proteinů. Na rozdíl od proteomiky je IHC metoda semikvantitativní. Když se exprese liší, ale na horním, respektive dolním konci škály (je proteinu málo, ale rozdílně nebo hodně, ale rozdílně), IHC nemusí tento rozdíl zachytit, protože je u všech negativní, respektive pozitivní. Je otázka, zda by to nezlepšila změna podmínek IHC vyšetření (například délka inkubace, koncentrace protilátky atd.) I přes výše uvedené se zhodnocení exprese INA a korelace s klinickými daty na velkém souboru nemocných jeví pozitivně a v současné době je připraven další grantový projekt. Výsledky by mohly přinést zlepšení strategie výběru ve volbě následné terapie. S ohledem na výsledky studií u jiných tumorů je nutno verifikovat i UCH-L1 a TPPP3 a jejich konkrétní roli.

Neléčená akromegalie má signifikantní morbiditu a mortalitu. Udávaná úspěšnost chirurgické léčby je přibližně kolem 70 %, podrobněji viz.kapitola 4.1. Somatostatinová analoga jsou léky volby ve farmakologické léčbě akromegalie, selže-li chirurgický výkon nebo je-li nádor inoperabilní. Využití mají také k překlenutí doby do nástupu efektu ozáření. Pokud není jejich efekt dostatečný, používá se s nimi antagonist pro receptor růstového hormonu pegvisomant. Agonisté dopaminu nejsou u akromegalie příliš efektivní. Většího efektu je nepřekvapivě dosaženo u adenomu s kosekrecí prolaktinu a při použití novějšího kabergolinu.^{191, 192} Některá data hovoří o větším efektu při kombinaci DA a SSA.¹³⁹ Dokonce byly vyvinuty chimerické molekuly (kombinovaná analoga) pro oba receptory. Klinické zkoušení dopastatinu (studie Tulipia) firmy Ipsen byla přerušena pro nedostatečný efekt a převažující dopaminergní účinky (hypotenze). Celková efektivita SSA v léčbě akromegalie se liší mezi studii.¹⁹³ Celkem 44 studií s octreotidem LAR nebo lanreotidem LAR jako primární nebo sekundární léčba akromegalie bylo zahrnuto do metaanalýzy. Některé studie byly kritizovány za selekční bias při výběru nemocných dle odpovědi GH na SSA. Ukázalo se, že octreotid byl efektivnější než lanreotid při normalizaci IGF-1 – 67 %, respektive 47 %. Ke zmenšení o 25-50 % došlo asi u 30 % nemocných a o 10-25 % u dalších 18 % v případě octreotidu, výsledky pro lanreotid byly horší – 15 % respektive 6 %. Důležité je, že u 60-75 % nemocných dojde k ústupu symptomů, jako jsou pocení, únava, bolesti kloubů a bolesti hlavy.¹⁹³ Bohužel SSA nejsou bez nežádoucích účinků. Dlouhodobá léčba SSA vede až u 40 % nemocných ke tvorbě žlučových kamenů vlivem oslabení kontrakcí žlučníku. Asi polovina nemocných má zažívací obtíže – nauseu, křeče a průjem, které mají tendenci se zlepšovat v čase. Méně často se objeví hypotyreóza, sinusová bradykardie, hyperglykémie

a alopecie. Nejnovějším somatostatinovým analogem je multiligandový pasireotid.^{194, 195} S novými multiligandovými analogy nabývá na významu znalost všech SSTR a jejich korelace s klinickými a biochemickými parametry.

Somatostatinová analoga jsou celkově až druhou volbou, neboť sice nabízejí možnost dosažení biochemické kontroly onemocnění, ale bohužel nejsou kurativní, a jejich nežádoucí účinky snižují jejich tolerabilitu. Možnost předvídat odpověď na SSA u akromegalie by mohlo lékařům pomoci vybrat to nejvhodnější somatostatinové analogum. Zejména podle jeho vazebné kapacity k jednotlivým somatostatinovým receptorům. Navíc, možnost předvídat odpověď na SSA by mohla eliminovat zbytečnou a/nebo dlouho trvající léčbu, mohla by vést k časnějšímu použití antagonisty růstového receptoru. Jeho oddálené použití je dnes dáno zejména jeho vysokou cenou. Jednou z možností ve snaze předpovědět odpověď je stanovení exprese somatostatinových receptorů. Expresi SSTR u somatotropních adenomů lze stanovit na úrovni mRNA^{145, 149, 196, 197} nebo pomocí imunohistochemického vyšetření,^{198, 199} dosud zejména za použití polyklonálních protilátek. Rutinní analýza SSTR je stále v oblasti kontroverze. Real-time RT-PCR je citlivější metoda umožňující kvantitativní zhodnocení. Imunohistochemická analýza je zavedenou metodikou v histologii. Nevýhodou je semikvantitativní hodnocení. Výhodou oproti real-time RT-PCR metodám je, že může být použita přímo na zpracované vzorky tumoru. Eliminuje se tedy potenciaální úskalí odběru tkáně, kdy pro PCR je nutno odebraný vzorek co nejrychleji zamrazit ve stabilizačním činidle, aby nedošlo k degradaci nestabilní RNA. Imunohistochemie rovněž umožňuje přímo analýzu lokalizace receptoru – např. intracelulárně cytoplasmaticky nebo na membráně. SSTR patří do rodiny receptorů spřažených s G proteinem a obsahujících 7 transmembránových domén. Dalo by se tedy předpokládat, že jen receptory exprimované na membráně jsou kompatibilní s jejich funkční rolí. Což by vysvětlovalo, proč některé tumory nereagují na terapii SSA. V minulosti byla popsána pozitivní korelace exprese SSTR2 a snížení GH v odpovědi na podání okterotidu nezávisle na lokalizaci.²⁰⁰ Stejní autoři pozorovali větší odpověď na podání okterotidu předoperačně u nemocných s vyšší expresí SSTR5 a SSTR2, zejména při expresi v cytoplasmě. Výsledky si vysvětlují tak, že po podání SSA dojde i internalizaci receptorů. Receptory mohou být samozřejmě v cytoplasmě i de novo syntetizované v endoplazmatickém retikulu.²⁰¹ Ve větší a recentní práci Casarborota et al. potvrdila různorodou expresi SSTR1,2,3 a 5 při použití monoklonálních protilátek. Expresi SSTR2 u předléčených adenomů byla nižší, ale po úpravě korelovala exprese SSTR2 s krátkodobou i

dlouhodobou léčbou.¹⁵³ Výsledky korelace mezi expresí mRNA SSTR2 a SSTR5 a odpovědí na léčbu SSA nebyly jednoznačné.^{145, 161, 196} Stejně tak jsou různá data pro korelaci exprese SSTR při stanovení různými metodami. Ve studii Wildemberga byla pozitivní korelace mezi mRNA SSTR2 receptoru a expresí na úrovni proteinu při analýze 13 somatotropních adenomů.²⁰² Ačkoli v případech, kdy byla exprese SSTR nižší, korelace chyběla. Shodu v expresi SSTR2 stanovené pomocí mRNA a IHC našli i ve studii Casarini et al.¹⁶² V našich datech exprese mRNA somatostatinových receptorů stanovená pomocí PCR nekoreluje s imunohistochemickým vyšetřením. Podobného výsledku, ale u adrenálních tumorů, dosáhl i Pisarek et al.²⁰³ Kompatibilita mezi vyšetřeními byla 62,5 % pro SSTR1 a 2, 50 % pro SSTR 4 a 5 a 37,5 % pro SSTR3. Zajímavá byla shoda 100 % pro SSTR2 u podskupiny hormonálně aktivních tumorů. V tomto případě byla kompatibilita SSTR5 66,5 %. Soubor nemocných byl rovněž menší (n=15). Rozdíl může být dán právě výše zmíněným úskalím celé procedury – od zpracování a hodnocení celkové exprese při real-time RT-PCR a přesnou analýzou lokalizace receptoru při IHC. Navíc exprese mRNA nemusí přímo odpovídat expresi proteinu nebo jeho funkčnosti vzhledem k potranslačním regulačním mechanismům proteinové syntézy. ICC je tedy spolehlivější. Úskalím PCR je i nestabilita RNA. Ve snaze hledat zjednodušené stavení exprese SSTR jsme v minulosti učinili pokus s in-situ hybridizací (RNAscope 2.0 FFPE Assay Advanced Cell Diagnostics, Inc., Hayward, CA, USA) pro stanovení RNA SSTR2 receptoru u klinicky afunkčních adenomů v parafinovém bločku. V preselektované skupině 25 nemocných s KAA se silnou expresí SSTR2 byla exprese stanovená pomocí RNAscope pozitivní jen v 9 případech.²⁰⁴ RNA in-situ hybridizace je tedy málo specifická a senzitivní. Stanovení exprese receptorů jen pomocí real-time RT-PCR je nedostatečné. Domníváme se, že stanovení receptorů imunohistochemickým vyšetřením by mělo být primární a spíše orientováno na receptory exprimované na membráně. Tyto poznatky považujeme za vhodné k ověření společně s odpovědí na terapii na velkém souboru nemocných, neboť mohou mít významný dopad na medikamentózní personalizovanou léčbu a potenciální redukci nákladné farmakologické léčby.

9 Závěr

Neurochirurgický výkon je volbou číslo jedna v terapii klinicky afunkčních adenomů. Při neúspěchu chirurgického výkonu by možnost predikce růstu residua pomohla klinikům zvolit optimální léčebnou strategii. Navíc predikce růstu by mohla eliminovat nadbytečné ozáření Leksellovým gama nožem, časté vyšetřování (magnetické rezonance) a/nebo farmakologickou léčbu. Námi, pomocí proteomické analýzy, zjištěné proteiny, které by mohly k predikci sloužit, se neukázaly signifikantně přínosné při verifikaci pomocí imunohistochemického vyšetření. Jediný protein, který byl u agresivnějších tumorů rozdílně (více) exprimován byl alpha-internexin. Rozdíl však nebyl statisticky signifikantně významný. Zhodnocení jeho exprese a korelace s klinickými daty na velkém souboru nemocných se jeví pozitivně a v současné době je připraven grantový projekt. Výsledky by mohly přinést zlepšení strategie výběru ve volbě následné terapie.

Stanovení exprese somatostatinových receptorů u akromegaliků pomocí imunohistochemického vyšetření nekoreluje s expresí mRNA somatostatinového receptoru. Použití imunohistochemického vyšetření s použitím ideálně monoklonálních protilátek proti SSTR se jeví jako lepší varianta a použití samotné real-time RT-PCR je pro stanovení exprese receptorů nedostatečné.

10 Literatura

1. SAEGER, W., LUDECKE, D. K., BUCHFELDER, M., FAHLBUSCH, R., QUABBE, H. J., PETERSENN, S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol*, 2007, vol. 156 no. 2, s. 203-216. doi:10.1530/eje.1.02326
2. EZZAT, S., ASA, S. L., COULDWELL, W. T., BARR, C. E., DODGE, W. E., VANCE, M. L., MCCUTCHEON, I. E. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*, 2004, vol. 101 no. 3, s. 613-619. doi:10.1002/cncr.20412
3. DALY, A. F., RIXHON, M., ADAM, C., DEMPEGIOTI, A., TICHOMIROWA, M. A., BECKERS, A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, vol. 91 no. 12, s. 4769-4775. doi:10.1210/jc.2006-1668
4. FERNANDEZ, A., KARAVITAKI, N., WASS, J. A. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, vol. 72 no. 3, s. 377-382. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03667.x
5. GRUPPETTA, M., MERCIECA, C., VASSALLO, J. Prevalence and incidence of pituitary adenomas: a population based study in Malta. *Pituitary*, 2013, vol. 16 no. 4, s. 545-553. doi:10.1007/s11102-012-0454-0
6. RAAPPANA, A., KOIVUKANGAS, J., EBELING, T., PIRILA, T. Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992-2007. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, vol. 95 no. 9, s. 4268-4275. doi:10.1210/jc.2010-0537
7. TJORNSTRAND, A., GUNNARSSON, K., EVERT, M., HOLMBERG, E., RAGNARSSON, O., ROSEN, T., FILIPSSON NYSTROM, H. The incidence rate of pituitary adenomas in western Sweden for the period 2001-2011. *Eur J Endocrinol*, 2014, vol. 171 no. 4, s. 519-526. doi:10.1530/EJE-14-0144
8. OSTROM, Q. T., GITTLEMAN, H., LIAO, P., VECCHIONE-KOVAL, T., WOLINSKY, Y., KRUCHKO, C., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol*, 2017, vol. 19 no. suppl_5, s. v1-v88. doi:10.1093/neuonc/nox158

9. MINDERMANN, T., WILSON, C. B. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1994, vol. 41 no. 3, s. 359-364. doi:10.1111/j.1365-2265.1994.tb02557.x
10. MAREK, J. Incidentalomy v endokrinologii - hypofýza. *Interní Med.*, 2001, vol. 8 no. 8, s. 358-362.
11. FERRANTE, E., FERRARONI, M., CASTRIGNANO, T., MENICATTI, L., ANAGNI, M., REIMONDO, G., DEL MONTE, P., BERNASCONI, D., LOLI, P., FAUSTINI-FUSTINI, M., BORRETTA, G., TERZOLO, M., LOSA, M., MORABITO, A., SPADA, A., BECK-PECCOZ, P., LANIA, A. G. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol*, 2006, vol. 155 no. 6, s. 823-829. doi:10.1530/eje.1.02298
12. LAVRENTAKI, A., PALUZZI, A., WASS, J. A., KARAVITAKI, N. Epidemiology of acromegaly: review of population studies. *Pituitary*, 2017, vol. 20 no. 1, s. 4-9. doi:10.1007/s11102-016-0754-x
13. BURTON, T., LE NESTOUR, E., NEARY, M., LUDLAM, W. H. Incidence and prevalence of acromegaly in a large US health plan database. *Pituitary*, 2016, vol. 19 no. 3, s. 262-267. doi:10.1007/s11102-015-0701-2
14. SESMILO, G. [Epidemiology of acromegaly in Spain]. *Endocrinol Nutr*, 2013, vol. 60 no. 8, s. 470-474. doi:10.1016/j.endonu.2012.09.010
15. MESTRON, A., WEBB, S. M., ASTORGA, R., BENITO, P., CATALA, M., GAZTAMBIDE, S., GOMEZ, J. M., HALPERIN, I., LUCAS-MORANTE, T., MORENO, B., OBIOLS, G., DE PABLOS, P., PARAMO, C., PICO, A., TORRES, E., VARELA, C., VAZQUEZ, J. A., ZAMORA, J., ALBAREDA, M., GILABERT, M. Epidemiology, clinical characteristics, outcome, morbidity and mortality in acromegaly based on the Spanish Acromegaly Registry (Registro Espanol de Acromegalia, REA). *Eur J Endocrinol*, 2004, vol. 151 no. 4, s. 439-446. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476442>
16. CANNAVO, S., FERRAU, F., RAGONESE, M., CURTO, L., TORRE, M. L., MAGISTRI, M., MARCHESE, A., ALIBRANDI, A., TRIMARCHI, F. Increased prevalence of acromegaly in a highly polluted area. *Eur J Endocrinol*, 2010, vol. 163 no. 4, s. 509-513. doi:10.1530/EJE-10-0465
17. ROSARIO, P. W., CALSOLARI, M. R. Screening for acromegaly by application of a simple questionnaire evaluating the enlargement of extremities in adult patients seen

- at primary health care units. *Pituitary*, 2012, vol. 15 no. 2, s. 179-183. doi:10.1007/s11102-011-0302-7
18. ROSARIO, P. W. Frequency of acromegaly in adults with diabetes or glucose intolerance and estimated prevalence in the general population. *Pituitary*, 2011, vol. 14 no. 3, s. 217-221. doi:10.1007/s11102-010-0281-0
 19. SCHNEIDER, H. J., SIEVERS, C., SALLER, B., WITTCHEN, H. U., STALLA, G. K. High prevalence of biochemical acromegaly in primary care patients with elevated IGF-1 levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, vol. 69 no. 3, s. 432-435. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03221.x
 20. GALERNEAU, L. M., PEPIN, J. L., BOREL, A. L., CHABRE, O., SAPENE, M., STACH, B., GIREY-RANNAUD, J., ARNOL, N., TAMISIER, R., CARON, P., SCIENTIFIC, COUNCIL, INVESTIGATORS OF THE FRENCH NATIONAL SLEEP APNOEA, REGISTRY. Acromegaly in sleep apnoea patients: a large observational study of 755 patients. *Eur Respir J*, 2016, vol. 48 no. 5, s. 1489-1492. doi:10.1183/13993003.01229-2016
 21. GREENMAN, Y., STERN, N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009, vol. 23 no. 5, s. 625-638. doi:10.1016/j.beem.2009.05.005
 22. METE, OZGUR, LOPES, M. BEATRIZ. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocrine Pathology*, 2017, vol. 28 no. 3, s. 228-243. doi:10.1007/s12022-017-9498-z
 23. ALEXANDER, J. M., BILLER, B. M., BIKKAL, H., ZERVAS, N. T., ARNOLD, A., KLIBANSKI, A. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest*, 1990, vol. 86 no. 1, s. 336-340. doi:10.1172/JCI114705
 24. LEVY, A., HALL, L., YEUDALL, W. A., LIGHTMAN, S. L. p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1994, vol. 41 no. 6, s. 809-814. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7889618>
 25. SPADA, A., LANIA, A., MANTOVANI, G. Hormonal signaling and pituitary adenomas. *Neuroendocrinology*, 2007, vol. 85 no. 2, s. 101-109. doi:10.1159/000100440
 26. ASA, S. L., EZZAT, S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*, 1998, vol. 19 no. 6, s. 798-827. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861546>
 27. TORDJMAN, K., STERN, N., OUAKNINE, G., YOSSIPHOV, Y., RAZON, N., NORDENSKJOLD, M., FRIEDMAN, E. Activating mutations of the Gs alpha-gene in

- nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, vol. 77 no. 3, s. 765-769. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396579>
28. TABOADA, G. F., TABEL, A. L., NAVES, L. A., DE CARVALHO, D. P.,GADELHA, M. R. Prevalence of gsp oncogene in somatotropinomas and clinically non-functioning pituitary adenomas: our experience. *Pituitary*, 2009, vol. 12 no. 3, s. 165-169. doi:10.1007/s11102-008-0136-0
 29. SPADA, A., LANIA, A.,BALLARE, E. G protein abnormalities in pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, vol. 142 no. 1-2, s. 1-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9783897>
 30. LANIA, A., MANTOVANI, G.,SPADA, A. Genetics of pituitary tumors: Focus on G-protein mutations. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003, vol. 228 no. 9, s. 1004-1017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530508>
 31. ZHANG, X., HORWITZ, G. A., PREZANT, T. R., VALENTINI, A., NAKASHIMA, M., BRONSTEIN, M. D.,MELMED, S. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*, 1999, vol. 13 no. 1, s. 156-166. doi:10.1210/mend.13.1.0225
 32. EZZAT, S., ZHENG, L., ZHU, X. F., WU, G. E.,ASA, S. L. Retraction. Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *J Clin Invest*, 2015, vol. 125 no. 8, s. 3303. doi:10.1172/JCI83399
 33. EZZAT, S., ZHENG, L., ZHU, X. F., WU, G. E.,ASA, S. L. Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *J Clin Invest*, 2002, vol. 109 no. 1, s. 69-78. doi:10.1172/JCI14036
 34. GEJMAN, R., BATISTA, D. L., ZHONG, Y., ZHOU, Y., ZHANG, X., SWEARINGEN, B., STRATAKIS, C. A., HEDLEY-WHYTE, E. T.,KLIBANSKI, A. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, vol. 93 no. 10, s. 4119-4125. doi:10.1210/jc.2007-2633
 35. SAMAAN, N. A., STEPANAS, A. V., DANZIGER, J.,TRUJILLO, J. Reactive pituitary abnormalities in patients with Klinefelter's and Turner's syndromes. *Arch Intern Med*, 1979, vol. 139 no. 2, s. 198-201. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/434974>
 36. ARAFAH, B. M., PRUNTY, D., YBARRA, J., HLAVIN, M. L.,SELMAN, W. R. The dominant role of increased intrasellar pressure in the pathogenesis of

- hypopituitarism, hyperprolactinemia, and headaches in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, vol. 85 no. 5, s. 1789-1793. doi:10.1210/jcem.85.5.6611
37. DEKKERS, O. M., PEREIRA, A. M., ROMIJN, J. A. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, vol. 93 no. 10, s. 3717-3726. doi:10.1210/jc.2008-0643
38. WILDEMBERG, L. E., GLEZER, A., BRONSTEIN, M. D., GADELHA, M. R. Apoplexy in nonfunctioning pituitary adenomas. *Pituitary*, 2018, vol. 10.1007/s11102-018-0870-xno. doi:10.1007/s11102-018-0870-x
39. YOUNG, W. F., JR., SCHEITHAUER, B. W., KOVACS, K. T., HORVATH, E., DAVIS, D. H., RANDALL, R. V. Gonadotroph adenoma of the pituitary gland: a clinicopathologic analysis of 100 cases. *Mayo Clin Proc*, 1996, vol. 71 no. 7, s. 649-656. doi:10.1016/S0025-6196(11)63002-4
40. COOPER, O., GELLER, J. L., MELMED, S. Ovarian hyperstimulation syndrome caused by an FSH-secreting pituitary adenoma. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, vol. 4 no. 4, s. 234-238. doi:10.1038/ncpendmet0758
41. HESELTINE, D., WHITE, M. C., KENDALL-TAYLOR, P., DE KRETZER, D. M., KELLY, W. Testicular enlargement and elevated serum inhibin concentrations occur in patients with pituitary macroadenomas secreting follicle stimulating hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1989, vol. 31 no. 4, s. 411-423. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2627747>
42. TABARIN, A., LAURENT, F., CATARGI, B., OLIVIER-PUEL, F., LESCENE, R., BERGE, J., GALLI, F. S., DROUILLARD, J., ROGER, P., GUERIN, J. Comparative evaluation of conventional and dynamic magnetic resonance imaging of the pituitary gland for the diagnosis of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1998, vol. 49 no. 3, s. 293-300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861318>
43. HAGIWARA, A., INOUE, Y., WAKASA, K., HABA, T., TASHIRO, T., MIYAMOTO, T. Comparison of growth hormone-producing and non-growth hormone-producing pituitary adenomas: imaging characteristics and pathologic correlation. *Radiology*, 2003, vol. 228 no. 2, s. 533-538. doi:10.1148/radiol.2282020695
44. MAREK, J. Hyperprolactinemia in practice. *Interní Med.*, 2008, vol. 10 no. 12, s. 549-554.

45. JAFFE, C. A. Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary*, 2006, vol. 9 no. 4, s. 317-321. doi:10.1007/s11102-006-0412-9
46. NOBELS, F. R., KWEKKEBOOM, D. J., COOPMANS, W., HOEKSTRA, R., DE HERDER, W. W., BOUILLON, R., LAMBERTS, S. W. A comparison between the diagnostic value of gonadotropins, alpha-subunit, and chromogranin-A and their response to thyrotropin-releasing hormone in clinically nonfunctioning, alpha-subunit-secreting, and gonadotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, vol. 77 no. 3, s. 784-789. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690365>
47. YOSHINO, A., KATAYAMA, Y., WATANABE, T., OGINO, A., OHTA, T., KOMINE, C., YOKOYAMA, T., FUKUSHIMA, T., HIROTA, H. Apoplexy accompanying pituitary adenoma as a complication of preoperative anterior pituitary function tests. *Acta Neurochir (Wien)*, 2007, vol. 149 no. 6, s. 557-565; discussion 565. doi:10.1007/s00701-007-1155-8
48. STÁRKA, LUBOSLAV, ZAMRAZIL, VÁCLAV. *Základy klinické endokrinologie*. 2005
49. ČÁP, JAN. Akutní stavy při onemocnění hypofýzy a hypothalamu. In *Akutní stavy v endokrinologii a diabetologii*, ch. 2, pp 27-36. Eds V Zamrazil, T Pelikánová. Praha: Galén, 2007.
50. ESTEVES, C., NEVES, C., AUGUSTO, L., MENEZES, J., PEREIRA, J., BERNARDES, I., FONSECA, J., CARVALHO, D. Pituitary incidentalomas: analysis of a neuroradiological cohort. *Pituitary*, 2015, vol. 18 no. 6, s. 777-781. doi:10.1007/s11102-015-0652-7
51. FAMINI, P., MAYA, M. M., MELMED, S. Pituitary magnetic resonance imaging for sellar and parasellar masses: ten-year experience in 2598 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, vol. 96 no. 6, s. 1633-1641. doi:10.1210/jc.2011-0168
52. VALASSI, E., BILLER, B. M., KLIBANSKI, A., SWEARINGEN, B. Clinical features of nonpituitary sellar lesions in a large surgical series. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, vol. 73 no. 6, s. 798-807. doi:10.1111/j.1365-2265.2010.03881.x
53. RAMOS-LEVI, A. M., MARAZUELA, M. Cardiovascular comorbidities in acromegaly: an update on their diagnosis and management. *Endocrine*, 2017, vol. 55 no. 2, s. 346-359. doi:10.1007/s12020-016-1191-3
54. MELMED, S. Acromegaly. In *The Pituitary*, ch. 15, pp 423-466. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2017.
55. RITVONEN, E., LOYTTYNIEMI, E., JAATINEN, P., EBELING, T., MOILANEN, L., NUUTILA, P., KAUPPINEN-MAKELIN, R., SCHALIN-JANTTI, C. Mortality in

- acromegaly: a 20-year follow-up study. *Endocr Relat Cancer*, 2016, vol. 23 no. 6, s. 469-480. doi:10.1530/ERC-16-0106
56. SHERLOCK, M., AYUK, J., TOMLINSON, J. W., TOOGOOD, A. A., ARAGON-ALONSO, A., SHEPPARD, M. C., BATES, A. S., STEWART, P. M. Mortality in patients with pituitary disease. *Endocr Rev*, 2010, vol. 31 no. 3, s. 301-342. doi:10.1210/er.2009-0033
57. ASA, S. L., BILBAO, J. M., KOVACS, K., LINFOOT, J. A. Hypothalamic neuronal hamartoma associated with pituitary growth hormone cell adenoma and acromegaly. *Acta Neuropathol*, 1980, vol. 52 no. 3, s. 231-234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7445985>
58. TRIVELLIN, G., DALY, A. F., FAUCZ, F. R., YUAN, B., ROSTOMYAN, L., LARCO, D. O., SCHERNTHANER-REITER, M. H., SZAREK, E., LEAL, L. F., CABERG, J. H., CASTERMANS, E., VILLA, C., DIMOPOULOS, A., CHITTIBOINA, P., XEKOUKI, P., SHAH, N., METZGER, D., LYSY, P. A., FERRANTE, E., STREBKOVA, N., MAZERKINA, N., ZATELLI, M. C., LODISH, M., HORVATH, A., DE ALEXANDRE, R. B., MANNING, A. D., LEVY, I., KEIL, M. F., SIERRA MDE, L., PALMEIRA, L., COPPIETERS, W., GEORGES, M., NAVES, L. A., JAMAR, M., BOURS, V., WU, T. J., CHOONG, C. S., BERTHERAT, J., CHANSON, P., KAMENICKY, P., FARRELL, W. E., BARLIER, A., QUEZADO, M., BJELOBABA, I., STOJILKOVIC, S. S., WESS, J., COSTANZI, S., LIU, P., LUPSKI, J. R., BECKERS, A., STRATAKIS, C. A. Gigantism and acromegaly due to Xq26 microduplications and GPR101 mutation. *N Engl J Med*, 2014, vol. 371 no. 25, s. 2363-2374. doi:10.1056/NEJMoa1408028
59. SALPEA, P., STRATAKIS, C. A. Carney complex and McCune Albright syndrome: an overview of clinical manifestations and human molecular genetics. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, vol. 386 no. 1-2, s. 85-91. doi:10.1016/j.mce.2013.08.022
60. BECKERS, A., AALTONEN, L. A., DALY, A. F., KARHU, A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr Rev*, 2013, vol. 34 no. 2, s. 239-277. doi:10.1210/er.2012-1013
61. REINCKE, M., ALLOLIO, B., SAEGER, W., MENZEL, J., WINKELMANN, W. The 'incidentaloma' of the pituitary gland. Is neurosurgery required? *JAMA*, 1990, vol. 263 no. 20, s. 2772-2776. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2332920>

62. DONOVAN, L. E., CORENBLUM, B. The natural history of the pituitary incidentaloma. *Arch Intern Med*, 1995, vol. 155 no. 2, s. 181-183. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811127>
63. NISHIZAWA, S., OHTA, S., YOKOYAMA, T., UEMURA, K. Therapeutic strategy for incidentally found pituitary tumors ("pituitary incidentalomas"). *Neurosurgery*, 1998, vol. 43 no. 6, s. 1344-1348; discussion 1348-1350. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9848848>
64. FELDKAMP, J., SANTEN, R., HARMS, E., AULICH, A., MODDER, U., SCHERBAUM, W. A. Incidentally discovered pituitary lesions: high frequency of macroadenomas and hormone-secreting adenomas - results of a prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1999, vol. 51 no. 1, s. 109-113. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469480>
65. IGARASHI, T., SAEKI, N., YAMAURA, A. Long-term magnetic resonance imaging follow-up of asymptomatic sellar tumors. -- their natural history and surgical indications. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1999, vol. 39 no. 8, s. 592-598; discussion 598-599. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10487038>
66. SANNO, N., OYAMA, K., TAHARA, S., TERAMOTO, A., KATO, Y. A survey of pituitary incidentaloma in Japan. *Eur J Endocrinol*, 2003, vol. 149 no. 2, s. 123-127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887289>
67. DAY, P. F., GUITELMAN, M., ARTESE, R., FISZLEDJER, L., CHERVIN, A., VITALE, N. M., STALLDECKER, G., DE MIGUEL, V., CORNALO, D., ALFIERI, A., SUSANA, M., GIL, M. Retrospective multicentric study of pituitary incidentalomas. *Pituitary*, 2004, vol. 7 no. 3, s. 145-148. doi:10.1007/s11102-005-1757-1
68. ARITA, K., TOMINAGA, A., SUGIYAMA, K., EGUCHI, K., IIDA, K., SUMIDA, M., MIGITA, K., KURISU, K. Natural course of incidentally found nonfunctioning pituitary adenoma, with special reference to pituitary apoplexy during follow-up examination. *J Neurosurg*, 2006, vol. 104 no. 6, s. 884-891. doi:10.3171/jns.2006.104.6.884
69. DEKKERS, O. M., HAMMER, S., DE KEIZER, R. J., ROELFSEMA, F., SCHUTTE, P. J., SMIT, J. W., ROMIJN, J. A., PEREIRA, A. M. The natural course of non-functioning pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol*, 2007, vol. 156 no. 2, s. 217-224. doi:10.1530/eje.1.02334
70. KARAVITAKI, N., COLLISON, K., HALLIDAY, J., BYRNE, J. V., PRICE, P., CUDLIP, S., WASS, J. A. What is the natural history of nonoperated nonfunctioning pituitary

- adenomas? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007, vol. 67 no. 6, s. 938-943. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02990.x
71. AGHAKHANI, K., KADIVAR, M., KAZEMI-ESFEH, S., ZAMANI, N., MORADI, M.,SANAIEI-ZADEH, H. Prevalence of pituitary incidentaloma in the Iranian cadavers. *Indian J Pathol Microbiol*, 2011, vol. 54 no. 4, s. 692-694. doi:10.4103/0377-4929.91493
 72. ANAGNOSTIS, P., ADAMIDOU, F., POLYZOS, S. A., EFSTATHIADOU, Z., PANAGIOTOU, A.,KITA, M. Pituitary incidentalomas: a single-centre experience. *Int J Clin Pract*, 2011, vol. 65 no. 2, s. 172-177. doi:10.1111/j.1742-1241.2010.02537.x
 73. LENDERS, N., IKEUCHI, S., RUSSELL, A. W., HO, K. K., PRINS, J. B.,INDER, W. J. Longitudinal evaluation of the natural history of conservatively managed nonfunctioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015, vol. 10.1111/cen.12879no. doi:10.1111/cen.12879
 74. IGLESIAS, P., ARCANO, K., TRIVINO, V., GARCIA-SANCHO, P., DIEZ, J. J., VILLABONA, C.,CORDIDO, F. Prevalence, Clinical Features, and Natural History of Incidental Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas. *Horm Metab Res*, 2017, vol. 49 no. 9, s. 654-659. doi:10.1055/s-0043-115645
 75. HUANG, W.,MOLITCH, M. E. Management of nonfunctioning pituitary adenomas (NFAs): observation. *Pituitary*, 2017, vol. 10.1007/s11102-017-0856-0no. doi:10.1007/s11102-017-0856-0
 76. FERNANDEZ-BALSELLS, M. M., MURAD, M. H., BARWISE, A., GALLEGOS-OROZCO, J. F., PAUL, A., LANE, M. A., LAMPROPULOS, J. F., NATIVIDAD, I., PERESTELO-PEREZ, L., PONCE DE LEON-LOVATON, P. G., ERWIN, P. J., CAREY, J.,MONTORI, V. M. Natural history of nonfunctioning pituitary adenomas and incidentalomas: a systematic review and metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, vol. 96 no. 4, s. 905-912. doi:10.1210/jc.2010-1054
 77. MOLITCH, M. E. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2008, vol. 37 no. 1, s. 151-171, xi. doi:10.1016/j.ecl.2007.10.011
 78. FREDA, P. U., BECKERS, A. M., KATZNELSON, L., MOLITCH, M. E., MONTORI, V. M., POST, K. D., VANCE, M. L.,ENDOCRINE, SOCIETY. Pituitary incidentaloma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, vol. 96 no. 4, s. 894-904. doi:10.1210/jc.2010-1048

79. LINDHOLM, J. A century of pituitary surgery: Schloffer's legacy. *Neurosurgery*, 2007, vol. 61 no. 4, s. 865-867; discussion 867-868. doi:10.1227/01.NEU.0000298916.09377.05
80. MELMED, S., KLEINBERG, D. Pituitary Masses and Tumors. In *Williams textbook of endocrinology*, edn 12th, ch. 9, pp 229-290. Ed S Melmed. United States of America: Elsevier Saunders, 2011.
81. MAREK, J. Incidentalomy v endokrinologii - hypofýza. *Interní Med.* 2001, 2001, vol. 8 no. 8, s. 358-362.
82. NETUKA, D., MASOPUST, V., BELSAN, T., KRAMAR, F., BENES, V. One year experience with 3.0 T intraoperative MRI in pituitary surgery. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, vol. 109 no. 157-159. doi:10.1007/978-3-211-99651-5_24
83. CESAK, T., NAHLOVSKY, J., HOSSZU, T., REHAK, S., LATR, I., NEMECEK, S., CAP, J., RYSKA, P., SUBA, P., CERMAN, J. Longitudinal Monitoring of the Growth of Post-Operation Non-Functioning Pituitary Adenomas. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*, 2009, vol. 72 no. 2, s. 115-124. <Go to ISI>://WOS:000265446500003
84. LOSA, M., MORTINI, P., BARZAGHI, R., RIBOTTO, P., TERRENI, M. R., MARZOLI, S. B., PIERALLI, S., GIOVANELLI, M. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenoma and analysis of the risk of tumor recurrence. *J Neurosurg*, 2008, vol. 108 no. 3, s. 525-532. doi:10.3171/JNS/2008/108/3/0525
85. CARON, P. [Clinically non functioning pituitary adenomas and gonadotroph-cell adenomas]. *Presse Med*, 2009, vol. 38 no. 1, s. 103-106. doi:10.1016/j.lpm.2008.10.001
86. NOMIKOS, P., LADAR, C., FAHLBUSCH, R., BUCHFELDER, M. Impact of primary surgery on pituitary function in patients with non-functioning pituitary adenomas -- a study on 721 patients. *Acta Neurochir (Wien)*, 2004, vol. 146 no. 1, s. 27-35. doi:10.1007/s00701-003-0174-3
87. ALAMEDA, C., LUCAS, T., PINEDA, E., BRITO, M., URIA, J. G., MAGALLON, R., ESTRADA, J., BARCELO, B. Experience in management of 51 non-functioning pituitary adenomas: indications for post-operative radiotherapy. *J Endocrinol Invest*, 2005, vol. 28 no. 1, s. 18-22. doi:2901 [pii]
88. DEKKERS, O. M., PEREIRA, A. M., ROELFSEMA, F., VOORMOLEN, J. H., NEELIS, K. J., SCHROIJEN, M. A., SMIT, J. W., ROMIJN, J. A. Observation alone after transsphenoidal

- surgery for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, vol. 91 no. 5, s. 1796-1801. doi:10.1210/jc.2005-2552
89. STEINER, E., KNOSP, E., HEROLD, C. J., KRAMER, J., STIGLBAUER, R., STANISZEWSKI, K., IMHOF, H. Pituitary adenomas: findings of postoperative MR imaging. *Radiology*, 1992, vol. 185 no. 2, s. 521-527. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1410366>
90. KRISTOF, R. A., ROTHER, M., NEULOH, G., KLINGMULLER, D. Incidence, clinical manifestations, and course of water and electrolyte metabolism disturbances following transsphenoidal pituitary adenoma surgery: a prospective observational study. *J Neurosurg*, 2009, vol. 111 no. 3, s. 555-562. doi:10.3171/2008.9.JNS08191
91. LOBATTO, D. J., DE VRIES, F., ZAMANIPOR NAJAFABADI, A. H., PEREIRA, A. M., PEUL, W. C., VLIET VLIELAND, T. P. M., BIERMASZ, N. R., VAN FURTH, W. R. Preoperative risk factors for postoperative complications in endoscopic pituitary surgery: a systematic review. *Pituitary*, 2018, vol. 21 no. 1, s. 84-97. doi:10.1007/s11102-017-0839-1
92. GABALEC, F., CAP, J. Clinically non-functioning pituitary adenomas - possibilities of medical treatment. *DMEV*, 2009, vol. 12 no. 2, s. 94-98.
93. EVEN-ZOHAR, N., GREENMAN, Y. Management of NFAs: medical treatment. *Pituitary*, 2018, vol. 10.1007/s11102-018-0865-7no. doi:10.1007/s11102-018-0865-7
94. GREENMAN, Y. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Present and future perspectives for medical therapy of nonfunctioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*, 2017, vol. 177 no. 3, s. R113-R124. doi:10.1530/EJE-17-0216
95. GABALEC, F., BERANEK, M., NETUKA, D., MASOPUST, V., NAHLOVSKY, J., CESAK, T., MAREK, J., CAP, J. Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*, 2012, vol. 15 no. 2, s. 222-226. doi:10.1007/s11102-011-0316-1
96. GREENMAN, Y., COOPER, O., YAISH, I., ROBENSHTOK, E., SAGIV, N., JONAS-KIMCHI, T., YUAN, X., GERTYCH, A., SHIMON, I., RAM, Z., MELMED, S., STERN, N. Treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists. *Eur J Endocrinol*, 2016, vol. 175 no. 1, s. 63-72. doi:10.1530/EJE-16-0206
97. PIVONELLO, R., MATRONE, C., FILIPPELLA, M., CAVALLO, L. M., DI SOMMA, C., CAPPABIANCA, P., COLAO, A., ANNUNZIATO, L., LOMBARDI, G. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison

- with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, vol. 89 no. 4, s. 1674-1683. doi:10.1210/jc.2003-030859
98. LOHMANN, T., TRANTAKIS, C., BIESOLD, M., PROTHMANN, S., GUENZEL, S., SCHOBER, R., PASCHKE, R. Minor tumour shrinkage in nonfunctioning pituitary adenomas by long-term treatment with the dopamine agonist cabergoline. *Pituitary*, 2001, vol. 4 no. 3, s. 173-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12138990>
99. DE HERDER, W. W., REIJS, A. E., FEELDERS, R. A., VAN AKEN, M. O., KRENNING, E. P., TANGHE, H. L., VAN DER LELY, A. J., KWEKKEBOOM, D. J. Dopamine agonist therapy of clinically non-functioning pituitary macroadenomas. Is there a role for 123I-epidepride dopamine D2 receptor imaging? *Eur J Endocrinol*, 2006, vol. 155 no. 5, s. 717-723. doi:10.1530/eje.1.02281
100. GARCIA, E. C., NAVES, L. A., SILVA, A. O., DE CASTRO, L. F., CASULARI, L. A., AZEVEDO, M. F. Short-term treatment with cabergoline can lead to tumor shrinkage in patients with nonfunctioning pituitary adenomas. *Pituitary*, 2013, vol. 16 no. 2, s. 189-194. doi:10.1007/s11102-012-0403-y
101. GABALEC, F., CAP, J., RADOCHA, J. [Valvular heart disease in relation to the treatment of hyperprolactinemia with dopamine agonists]. *Vnitr Lek*, 2017, vol. 63 no. 9, s. 561-565. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29120651>
102. GABALEC, F., DRASTIKOVA, M., CESAK, T., NETUKA, D., MASOPUST, V., 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, vol. 64 no. 3, s. 369-377. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536318>
103. COLAO, A., DI SOMMA, C., PIVONELLO, R., FAGGIANO, A., LOMBARDI, G., SAVASTANO, S. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer*, 2008, vol. 15 no. 4, s. 905-915. doi:10.1677/ERC-08-0181
104. FUSCO, A., GIAMPIETRO, A., BIANCHI, A., CIMINO, V., LUGLI, F., PIACENTINI, S., LORUSSO, M., TOFANI, A., PEROTTI, G., LAURIOLA, L., ANILE, C., MAIRA, G., PONTECORVI, A., DE MARINIS, L. Treatment with octreotide LAR in clinically non-functioning pituitary adenoma: results from a case-control study. *Pituitary*, 2012, vol. 15 no. 4, s. 571-578. doi:10.1007/s11102-011-0370-8
105. ZATELLI, M. C., PICCIN, D., BOTTONI, A., AMBROSIO, M. R., MARGUTTI, A., PADOVANI, R., SCANARINI, M., TAYLOR, J. E., CULLER, M. D., CAVAZZINI, L., DEGLI

- UBERTI, E. C. Evidence for differential effects of selective somatostatin receptor subtype agonists on alpha-subunit and chromogranin a secretion and on cell viability in human nonfunctioning pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, vol. 89 no. 10, s. 5181-5188. doi:10.1210/jc.2003-031954
106. HALEVY, C., WHITELAW, B. C. How effective is temozolomide for treating pituitary tumours and when should it be used? *Pituitary*, 2017, vol. 20 no. 2, s. 261-266. doi:10.1007/s11102-016-0745-y
107. KOMOR, J., REUBI, J. C., CHRIST, E. R. Peptide receptor radionuclide therapy in a patient with disabling non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary*, 2014, vol. 17 no. 3, s. 227-231. doi:10.1007/s11102-013-0494-0
108. MACLEAN, J., ALDRIDGE, M., BOMANJI, J., SHORT, S., FERSHT, N. Peptide receptor radionuclide therapy for aggressive atypical pituitary adenoma/carcinoma: variable clinical response in preliminary evaluation. *Pituitary*, 2014, vol. 17 no. 6, s. 530-538. doi:10.1007/s11102-013-0540-y
109. MINNITI, G., FLICKINGER, J., TOLU, B., PAOLINI, S. Management of nonfunctioning pituitary tumors: radiotherapy. *Pituitary*, 2018, vol. 10.1007/s11102-018-0868-4no. doi:10.1007/s11102-018-0868-4
110. BURMAN, P., VAN BEEK, A. P., BILLER, B. M., CAMACHO-HUBNER, C., MATTSSON, A. F. Radiotherapy, Especially at Young Age, Increases the Risk for De Novo Brain Tumors in Patients Treated for Pituitary/Sellar Lesions. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, vol. 102 no. 3, s. 1051-1058. doi:10.1210/jc.2016-3402
111. YAMANAKA, R., ABE, E., SATO, T., HAYANO, A., TAKASHIMA, Y. Secondary Intracranial Tumors Following Radiotherapy for Pituitary Adenomas: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*, 2017, vol. 9 no. 8, s. doi:10.3390/cancers9080103
112. JEZKOVA, J., MAREK, J., HANA, V., KRSEK, M., WEISS, V., VLADYKA, V., LISAK, R., VYMAZAL, J., PECEN, L. Gamma knife radiosurgery for acromegaly--long-term experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2006, vol. 64 no. 5, s. 588-595. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02513.x
113. MAREK, J., JEZKOVA, J., HANA, V., KRSEK, M., BANDUROVA, L., PECEN, L., VLADYKA, V., LISCAK, R. Is it possible to avoid hypopituitarism after irradiation of pituitary adenomas by the Leksell gamma knife? *Eur J Endocrinol*, 2011, vol. 164 no. 2, s. 169-178. doi:10.1530/EJE-10-0733

114. LOEFFLER, J. S., SHIH, H. A. Radiation therapy in the management of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, vol. 96 no. 7, s. 1992-2003. doi:10.1210/jc.2011-0251
115. CORTET-RUDELLI, C., BONNEVILLE, J. F., BORSON-CHAZOT, F., CLAVIER, L., COCHE DEQUEANT, B., DESAILLOUD, R., MAITER, D., ROHMER, V., SADOUL, J. L., SONNET, E., TOUSSAINT, P., CHANSON, P. Post-surgical management of non-functioning pituitary adenoma. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2015, vol. 76 no. 3, s. 228-238. doi:10.1016/j.ando.2015.04.003
116. TAMPOURLOU, M., NTALI, G., AHMED, S., ARLT, W., AYUK, J., BYRNE, J. V., CHAVDA, S., CUDLIP, S., GITTOES, N., GROSSMAN, A., MITCHELL, R., O'REILLY, M. W., PALUZZI, A., TOOGOOD, A., WASS, J. A. H., KARAVITAKI, N. Outcome of Nonfunctioning Pituitary Adenomas That Regrow After Primary Treatment: A Study From Two Large UK Centers. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, vol. 102 no. 6, s. 1889-1897. doi:10.1210/jc.2016-4061
117. CHEN, Y., WANG, C. D., SU, Z. P., CHEN, Y. X., CAI, L., ZHUGE, Q. C., WU, Z. B. Natural history of postoperative nonfunctioning pituitary adenomas: a systematic review and meta-analysis. *Neuroendocrinology*, 2012, vol. 96 no. 4, s. 333-342. doi:10.1159/000339823
118. MURAD, M. H., FERNANDEZ-BALSELLS, M. M., BARWISE, A., GALLEGOS-OROZCO, J. F., PAUL, A., LANE, M. A., LAMPROPULOS, J. F., NATIVIDAD, I., PERESTELO-PEREZ, L., PONCE DE LEON-LOVATON, P. G., ALBUQUERQUE, F. N., CAREY, J., ERWIN, P. J., MONTORI, V. M. Outcomes of surgical treatment for nonfunctioning pituitary adenomas: a systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, vol. 73 no. 6, s. 777-791. doi:10.1111/j.1365-2265.2010.03875.x
119. O'REILLY, M. W., REULEN, R. C., GUPTA, S., THOMPSON, C. A., DINEEN, R., GOULDEN, E. L., BUGG, G., PEARCE, H., TOOGOOD, A. A., GITTOES, N. J., MITCHELL, R., THOMPSON, C. J., AYUK, J. ACTH and gonadotropin deficiencies predict mortality in patients treated for nonfunctioning pituitary adenoma: long-term follow-up of 519 patients in two large European centres. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2016, vol. 85 no. 5, s. 748-756. doi:10.1111/cen.13141
120. O'SULLIVAN, E. P., WOODS, C., GLYNN, N., BEHAN, L. A., CROWLEY, R., O'KELLY, P., SMITH, D., THOMPSON, C. J., AGHA, A. The natural history of surgically treated

- but radiotherapy-naive nonfunctioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, vol. 71 no. 5, s. 709-714. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03583.x
121. REDDY, R., CUDLIP, S., BYRNE, J. V., KARAVITAKI, N., WASS, J. A. Can we ever stop imaging in surgically treated and radiotherapy-naive patients with non-functioning pituitary adenoma? *Eur J Endocrinol*, 2011, vol. 165 no. 5, s. 739-744. doi:10.1530/EJE-11-0566
 122. SHEEHAN, J. P., STARKE, R. M., MATHIEU, D., YOUNG, B., SNEED, P. K., CHIANG, V. L., LEE, J. Y., KANO, H., PARK, K. J., NIRANJAN, A., KONDZIOLKA, D., BARNETT, G. H., RUSH, S., GOLFINOS, J. G., LUNSFORD, L. D. Gamma Knife radiosurgery for the management of nonfunctioning pituitary adenomas: a multicenter study. *J Neurosurg*, 2013, vol. 119 no. 2, s. 446-456. doi:10.3171/2013.3.JNS12766
 123. ROELFSEMA, F., BIERMASZ, N. R., PEREIRA, A. M. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. *Pituitary*, 2012, vol. 15 no. 1, s. 71-83. doi:10.1007/s11102-011-0347-7
 124. NOH, T. W., JEONG, H. J., LEE, M. K., KIM, T. S., KIM, S. H., LEE, E. J. Predicting recurrence of nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, vol. 94 no. 11, s. 4406-4413. doi:10.1210/jc.2009-0471
 125. CAP, J., CERMAN, J., NEMECEK, S., MAREKOVA, M., HANA, V., FRYSAK, Z. The influence of treatment with somatostatin analogues on morphology, proliferative and apoptotic activity in GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Neurosci*, 2003, vol. 10 no. 4, s. 444-448. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852883>
 126. CESAK, T., NAHLOVSKY, J., HOSSZU, T., REHAK, S., LATR, I., NEMECEK, S., CAP, J., RYSKA, P., SUBA, P., CERMAN, J. Longitudinální sledování růstu pooperačních reziduí afunkčních adenomů hypofýzy. *Cesk Slov Neurol*, 2009, vol. 72/105 no. 2, s. 115-124.
 127. BEN-SHLOMO, A., COOPER, O. Silent corticotroph adenomas. *Pituitary*, 2018, vol. 10.1007/s11102-018-0864-8no. doi:10.1007/s11102-018-0864-8
 128. HU, X., ZHANG, P., SHANG, A., LI, Q., XIA, Y., JIA, G., LIU, W., XIAO, X., HE, D. A primary proteomic analysis of serum from patients with nonfunctioning pituitary adenoma. *J Int Med Res*, 2012, vol. 40 no. 1, s. 95-104. doi:10.1177/147323001204000110

129. MORENO, C. S., EVANS, C. O., ZHAN, X., OKOR, M., DESIDERIO, D. M., OYESIKU, N. M. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res*, 2005, vol. 65 no. 22, s. 10214-10222. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0884
130. ZHAN, X., EVANS, C. O., OYESIKU, N. M., DESIDERIO, D. M. Proteomics and transcriptomics analyses of secretagogin down-regulation in human non-functional pituitary adenomas. *Pituitary*, 2003, vol. 6 no. 4, s. 189-202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15237930>
131. KATZNELSON, L., LAWS, E. R., JR., MELMED, S., MOLITCH, M. E., MURAD, M. H., UTZ, A., WASS, J. A., ENDOCRINE, SOCIETY. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, vol. 99 no. 11, s. 3933-3951. doi:10.1210/jc.2014-2700
132. NETUKA, D., MAJOVSKY, M., MASOPUST, V., BELSAN, T., MAREK, J., KRSEK, M., HANA, V., JEZKOVA, J., HANA, V., JR., BENES, V. Intraoperative Magnetic Resonance Imaging During Endoscopic Transsphenoidal Surgery of Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenomas. *World Neurosurg*, 2016, vol. 91 no. 490-496. doi:10.1016/j.wneu.2016.04.094
133. HAZER, D. B., ISIK, S., BERKER, D., GULER, S., GURLEK, A., YUCEL, T., BERKER, M. Treatment of acromegaly by endoscopic transsphenoidal surgery: surgical experience in 214 cases and cure rates according to current consensus criteria. *J Neurosurg*, 2013, vol. 119 no. 6, s. 1467-1477. doi:10.3171/2013.8.JNS13224
134. HOFSTETTER, C. P., SHIN, B. J., MUBITA, L., HUANG, C., ANAND, V. K., BOOCKVAR, J. A., SCHWARTZ, T. H. Endoscopic endonasal transsphenoidal surgery for functional pituitary adenomas. *Neurosurg Focus*, 2011, vol. 30 no. 4, s. E10. doi:10.3171/2011.1.FOCUS10317
135. JANE, J. A., JR., STARKE, R. M., ELZOGHBY, M. A., REAMES, D. L., PAYNE, S. C., THORNER, M. O., MARSHALL, J. C., LAWS, E. R., JR., VANCE, M. L. Endoscopic transsphenoidal surgery for acromegaly: remission using modern criteria, complications, and predictors of outcome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, vol. 96 no. 9, s. 2732-2740. doi:10.1210/jc.2011-0554
136. WANG, Y. Y., HIGHAM, C., KEARNEY, T., DAVIS, J. R., TRAINER, P., GNANALINGHAM, K. K. Acromegaly surgery in Manchester revisited--the impact of reducing surgeon

- numbers and the 2010 consensus guidelines for disease remission. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2012, vol. 76 no. 3, s. 399-406. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04193.x
137. BABU, H., ORTEGA, A., NUNO, M., DEGHAN, A., SCHWEITZER, A., BONERT, H. V., CARMICHAEL, J. D., COOPER, O., MELMED, S., MAMELAK, A. N. Long-Term Endocrine Outcomes Following Endoscopic Endonasal Transsphenoidal Surgery for Acromegaly and Associated Prognostic Factors. *Neurosurgery*, 2017, vol. 10.1093/neuros/nyx020no. doi:10.1093/neuros/nyx020
 138. COLAO, A., PIVONELLO, R., DI SOMMA, C., SAVASTANO, S., GRASSO, L. F., LOMBARDI, G. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. *Rev Endocr Metab Disord*, 2009, vol. 10 no. 2, s. 111-123. doi:10.1007/s11154-008-9107-z
 139. MARZULLO, P., FERONE, D., DI SOMMA, C., PIVONELLO, R., FILIPPELLA, M., LOMBARDI, G., COLAO, A. Efficacy of combined treatment with lanreotide and cabergoline in selected therapy-resistant acromegalic patients. *Pituitary*, 1999, vol. 1 no. 2, s. 115-120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081189>
 140. PATEL, Y. C. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, 1999, vol. 20 no. 3, s. 157-198. doi:10.1006/frne.1999.0183
 141. DURAN-PRADO, M., GAHETE, M. D., MARTINEZ-FUENTES, A. J., LUQUE, R. M., QUINTERO, A., WEBB, S. M., BENITO-LOPEZ, P., LEAL, A., SCHULZ, S., GRACIA-NAVARRO, F., MALAGON, M. M., CASTANO, J. P. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, vol. 94 no. 7, s. 2634-2643. doi:10.1210/jc.2008-2564
 142. BRUNS, C., LEWIS, I., BRINER, U., MENO-TETANG, G., WECKBECKER, G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol*, 2002, vol. 146 no. 5, s. 707-716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980628>
 143. GADELHA, M. R., WILDEMBERG, L. E., BRONSTEIN, M. D., GATTO, F., FERONE, D. Somatostatin receptor ligands in the treatment of acromegaly. *Pituitary*, 2017, vol. 20 no. 1, s. 100-108. doi:10.1007/s11102-017-0791-0
 144. CHAHAL, H. S., TRIVELLIN, G., LEONTIOU, C. A., ALBAND, N., FOWKES, R. C., TAHIR, A., IGREJA, S. C., CHAPPLE, J. P., JORDAN, S., LUPP, A., SCHULZ, S., ANSORGE, O., KARAVITAKI, N., CARLSEN, E., WASS, J. A., GROSSMAN, A. B., KORBONITS, M.

- Somatostatin analogs modulate AIP in somatotroph adenomas: the role of the ZAC1 pathway. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, vol. 97 no. 8, s. E1411-1420. doi:10.1210/jc.2012-1111
145. TABOADA, G. F., LUQUE, R. M., NETO, L. V., MACHADO EDE, O., SBAFFI, B. C., DOMINGUES, R. C., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., FONTES, R., NIEMEYER, P., DE CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D.,GADELHA, M. R. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol*, 2008, vol. 158 no. 3, s. 295-303. doi:10.1530/EJE-07-0562
146. HOFLAND, L. J.,LAMBERTS, S. W. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev*, 2003, vol. 24 no. 1, s. 28-47. doi:10.1210/er.2000-0001
147. MELMED, S., COOK, D., SCHOPOHL, J., GOTH, M. I., LAM, K. S.,MAREK, J. Rapid and sustained reduction of serum growth hormone and insulin-like growth factor-1 in patients with acromegaly receiving lanreotide Autogel therapy: a randomized, placebo-controlled, multicenter study with a 52 week open extension. *Pituitary*, 2010, vol. 13 no. 1, s. 18-28. doi:10.1007/s11102-009-0191-1
148. SHERLOCK, M., FERNANDEZ-RODRIGUEZ, E., ALONSO, A. A., REULEN, R. C., AYUK, J., CLAYTON, R. N., HOLDER, G., SHEPPARD, M. C., BATES, A.,STEWART, P. M. Medical therapy in patients with acromegaly: predictors of response and comparison of efficacy of dopamine agonists and somatostatin analogues. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, vol. 94 no. 4, s. 1255-1263. doi:10.1210/jc.2008-1420
149. DRASTIKOVA, M., BERANEK, M., GABALEC, F., NETUKA, D., MASOPUST, V., CESAK, T., MAREK, J., PALICKA, V.,CAP, J. Expression profiles of somatostatin, dopamine, and estrogen receptors in pituitary adenomas determined by means of synthetic multilocus calibrators. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2016, vol. 160 no. 2, s. 238-243. doi:10.5507/bp.2015.058
150. TABOADA, G. F., LUQUE, R. M., BASTOS, W., GUIMARAES, R. F., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., FONTES, R., MATA, P. J., FILHO, P. N., CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D.,GADELHA, M. R. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning

- pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*, 2007, vol. 156 no. 1, s. 65-74. doi:10.1530/eje.1.02313
151. GATTO, F., FEELDERS, R., VAN DER PAS, R., KROS, J. M., DOGAN, F., VAN KOETSVELD, P. M., VAN DER LELIJ, A. J., NEGGERS, S. J., MINUTO, F., DE HERDER, W., LAMBERTS, S. W., FERONE, D., HOFLAND, L. J. beta-Arrestin 1 and 2 and G protein-coupled receptor kinase 2 expression in pituitary adenomas: role in the regulation of response to somatostatin analogue treatment in patients with acromegaly. *Endocrinology*, 2013, vol. 154 no. 12, s. 4715-4725. doi:10.1210/en.2013-1672
152. CHINEZU, L., VASILJEVIC, A., JOUANNEAU, E., FRANCOIS, P., BORDA, A., TROUILLAS, J., RAVEROT, G. Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies. *Hum Pathol*, 2014, vol. 45 no. 1, s. 71-77. doi:10.1016/j.humpath.2013.08.007
153. CASAR-BOROTA, O., HECK, A., SCHULZ, S., NESLAND, J. M., RAMM-PETTERSEN, J., LEKVA, T., ALAFUZOFF, I., BOLLERSLEV, J. Expression of SSTR2a, but not of SSTRs 1, 3, or 5 in somatotroph adenomas assessed by monoclonal antibodies was reduced by octreotide and correlated with the acute and long-term effects of octreotide. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, vol. 98 no. 11, s. E1730-1739. doi:10.1210/jc.2013-2145
154. HOFLAND, L. J., VAN DER HOEK, J., VAN KOETSVELD, P. M., DE HERDER, W. W., WAAIJERS, M., SPRIJ-MOOIJ, D., BRUNS, C., WECKBECKER, G., FEELDERS, R., VAN DER LELY, A. J., BECKERS, A., LAMBERTS, S. W. The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, vol. 89 no. 4, s. 1577-1585. doi:10.1210/jc.2003-031344
155. GATTO, F., FEELDERS, R. A., VAN DER PAS, R., KROS, J. M., WAAIJERS, M., SPRIJ-MOOIJ, D., NEGGERS, S. J., VAN DER LELIJ, A. J., MINUTO, F., LAMBERTS, S. W., DE HERDER, W. W., FERONE, D., HOFLAND, L. J. Immunoreactivity score using an anti-sst2A receptor monoclonal antibody strongly predicts the biochemical response to adjuvant treatment with somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, vol. 98 no. 1, s. E66-71. doi:10.1210/jc.2012-2609
156. SAVEANU, A., GUNZ, G., DUFOUR, H., CARON, P., FINA, F., OUAFIK, L., CULLER, M. D., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A., JAQUET, P. Bim-23244, a somatostatin receptor

- subtype 2- and 5-selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, vol. 86 no. 1, s. 140-145. doi:10.1210/jcem.86.1.7099
157. LUQUE, R. M., IBANEZ-COSTA, A., NETO, L. V., TABOADA, G. F., HORMAECHEA-AGULLA, D., KASUKI, L., VENEGAS-MORENO, E., MORENO-CARAZO, A., GALVEZ, M. A., SOTO-MORENO, A., KINEMAN, R. D., CULLER, M. D., GAHETE, M. D., GADELHA, M. R., CASTANO, J. P. Truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 confers aggressive features (proliferation, invasion and reduced octreotide response) to somatotropinomas. *Cancer Lett*, 2015, vol. 359 no. 2, s. 299-306. doi:10.1016/j.canlet.2015.01.037
158. FOUIGNER, S. L., BOROTA, O. C., BERG, J. P., HALD, J. K., RAMM-PETTERSEN, J., BOLLERSLEV, J. The clinical response to somatostatin analogues in acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, vol. 68 no. 3, s. 458-465. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.03065.x
159. KATO, M., INOSHITA, N., SUGIYAMA, T., TANI, Y., SHICHIRI, M., SANO, T., YAMADA, S., HIRATA, Y. Differential expression of genes related to drug responsiveness between sparsely and densely granulated somatotroph adenomas. *Endocr J*, 2012, vol. 59 no. 3, s. 221-228. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22200580>
160. BRZANA, J., YEDINAK, C. G., GULTEKIN, S. H., DELASHAW, J. B., FLESERIU, M. Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience. *Pituitary*, 2013, vol. 16 no. 4, s. 490-498. doi:10.1007/s11102-012-0445-1
161. PARK, C., YANG, I., WOO, J., KIM, S., KIM, J., KIM, Y., SOHN, S., KIM, E., LEE, M., PARK, H., JUNG, J., PARK, S. Somatostatin (SRIF) receptor subtype 2 and 5 gene expression in growth hormone-secreting pituitary adenomas: the relationship with endogenous srif activity and response to octreotide. *Endocr J*, 2004, vol. 51 no. 2, s. 227-236. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118275>
162. CASARINI, A. P., JALLAD, R. S., PINTO, E. M., SOARES, I. C., NONOGAKI, S., GIANNELLA-NETO, D., MUSOLINO, N. R., ALVES, V. A., BRONSTEIN, M. D. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and

- response to octreotide-lar treatment. *Pituitary*, 2009, vol. 12 no. 4, s. 297-303. doi:10.1007/s11102-009-0175-1
163. HARAGUCHI, K., OHTAKA, M., TAKAZAWA, K., ENDO, T., ONAYA, T. Desensitization to somatostatin analogue (Octreotide) observed in a patient with acromegaly. *Endocr J*, 1995, vol. 42 no. 2, s. 295-300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627275>
164. WAHID, S. T., MARBACH, P., STOLZ, B., MILLER, M., JAMES, R. A., BALL, S. G. Partial tachyphylaxis to somatostatin (SST) analogues in a patient with acromegaly: the role of SST receptor desensitisation and circulating antibodies to SST analogues. *Eur J Endocrinol*, 2002, vol. 146 no. 3, s. 295-302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11888834>
165. CARLSEN, S. M., SVARTBERG, J., SCHREINER, T., AANDERUD, S., JOHANNESSEN, O., SKEIE, S., LUND-JOHANSEN, M., FOUGNER, S. L., BOLLERSLEV, J., GROUP, POTA STUDY. Six-month preoperative octreotide treatment in unselected, de novo patients with acromegaly: effect on biochemistry, tumour volume, and postoperative cure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2011, vol. 74 no. 6, s. 736-743. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.03982.x
166. BERANEK, MARTIN, DRASTIKOVA, M., GABALEC, F., PALIČKA, V., CAP, J. Syntetický multilokusový kalibrátor pro studium genové exprese v nádorech hypofýzy vyvolávajících akromegalii. *Chemické listy*, 2015, vol. no. 109, s. 938-941.
167. RAVEROT, G., JOUANNEAU, E., TROUILLAS, J. Management of endocrine disease: clinicopathological classification and molecular markers of pituitary tumours for personalized therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol*, 2014, vol. 170 no. 4, s. R121-132. doi:10.1530/EJE-13-1031
168. ZHENG, X., LI, S., ZHANG, W., ZANG, Z., HU, J., YANG, H. Current biomarkers of invasive sporadic pituitary adenomas. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2016, vol. 77 no. 6, s. 658-667. doi:10.1016/j.ando.2016.02.004
169. GABALEC, F., TAMBOR, V., VU, DL., DRASTIKOVA, M., NETUKA, D., MASOPUST, V., CESAČ, T., BERANEK, M., CAP, J., LENCO, J. More Progressive Clinically Non-Functioning Adenomas Express Significantly Different Proteins. *ENDO 2015*. 2015.
170. GRABBE, C., HUSNJAK, K., DIKIC, I. The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, vol. 12 no. 5, s. 295-307. doi:10.1038/nrm3099

171. MABB, A. M., EHLERS, M. D. Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, vol. 26 no. 179-210. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104129
172. BISHOP, P., ROCCA, D., HENLEY, J. M. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J*, 2016, vol. 473 no. 16, s. 2453-2462. doi:10.1042/BCJ20160082
173. CHOI, J., LEVEY, A. I., WEINTRAUB, S. T., REES, H. D., GEARING, M., CHIN, L. S., LI, L. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279 no. 13, s. 13256-13264. doi:10.1074/jbc.M314124200
174. WADA, H., KITO, K., CASKEY, L. S., YEH, E. T., KAMITANI, T. Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, vol. 251 no. 3, s. 688-692. doi:10.1006/bbrc.1998.9532
175. SAIGOH, K., WANG, Y. L., SUH, J. G., YAMANISHI, T., SAKAI, Y., KIYOSAWA, H., HARADA, T., ICHIHARA, N., WAKANA, S., KIKUCHI, T., WADA, K. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet*, 1999, vol. 23 no. 1, s. 47-51. doi:10.1038/12647
176. WALTERS, B. J., CAMPBELL, S. L., CHEN, P. C., TAYLOR, A. P., SCHROEDER, D. G., DOBRUNZ, L. E., ARTAVANIS-TSAKONAS, K., PLOEGH, H. L., WILSON, J. A., COX, G. A., WILSON, S. M. Differential effects of Usp14 and Uch-L1 on the ubiquitin proteasome system and synaptic activity. *Mol Cell Neurosci*, 2008, vol. 39 no. 4, s. 539-548. doi:10.1016/j.mcn.2008.07.028
177. PACHTER, J. S., LIEM, R. K. alpha-Internexin, a 66-kD intermediate filament-binding protein from mammalian central nervous tissues. *J Cell Biol*, 1985, vol. 101 no. 4, s. 1316-1322. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413040>
178. WILLOUGHBY, V., SONAWALA, A., WERLANG-PERURENA, A., DONNER, L. R. A comparative immunohistochemical analysis of small round cell tumors of childhood: utility of peripherin and alpha-internexin as markers for neuroblastomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008, vol. 16 no. 4, s. 344-348. doi:10.1097/PAI.0b013e318165fe78
179. MOKHTARI, K., DUCRAY, F., KROS, J. M., GORLIA, T., IDBAIH, A., TAPHOORN, M., WESSELING, P., HOANG-XUAN, K., VAN DEN BENT, M., SANSON, M. Alpha-internexin expression predicts outcome in anaplastic oligodendroglial tumors and may

- positively impact the efficacy of chemotherapy: European organization for research and treatment of cancer trial 26951. *Cancer*, 2011, vol. 117 no. 13, s. 3014-3026. doi:10.1002/cncr.25827
180. DUCRAY, F., MOKHTARI, K., CRINIÈRE, E., IDBAIH, A., MARIE, Y., DEHAIS, C., PARIS, S., CARPENTIER, C., DIÈME, M. J., ADAM, C., HOANG-XUAN, K., DUYCKAERTS, C., DELATTRE, J. Y., SANSON, M. Diagnostic and prognostic value of alpha internexin expression in a series of 409 gliomas. *Eur J Cancer*, 2011, vol. 47 no. 5, s. 802-808. doi:10.1016/j.ejca.2010.11.031
181. NAGAISHI, M., SUZUKI, A., NOBUSAWA, S., YOKOO, H., NAKAZATO, Y. Alpha-internexin and altered CIC expression as a supportive diagnostic marker for oligodendroglial tumors with the 1p/19q co-deletion. *Brain Tumor Pathol*, 2014, vol. 31 no. 4, s. 257-264. doi:10.1007/s10014-013-0168-7
182. EIGENBROD, S., ROEBER, S., THON, N., GIESE, A., KRIEGER, A., GRASBON-FRODL, E., EGENSPERGER, R., TONN, J. C., KRETH, F. W., KRETZSCHMAR, H. A. alpha-Internexin in the diagnosis of oligodendroglial tumors and association with 1p/19q status. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, vol. 70 no. 11, s. 970-978. doi:10.1097/NEN.0b013e3182333ef5
183. SCHULT, D., HOLSKEN, A., BUCHFELDER, M., SCHLAFFER, S. M., SIEGEL, S., KREITSCHMANN-ANDERMAHR, I., FAHLBUSCH, R., BUSLEI, R. Expression pattern of neuronal intermediate filament alpha-internexin in anterior pituitary gland and related tumors. *Pituitary*, 2015, vol. 18 no. 4, s. 465-473. doi:10.1007/s11102-014-0597-2
184. LIU, B., TANG, L. H., LIU, Z., MEI, M., YU, R., DHALL, D., QIAO, X. W., ZHANG, T. P., ZHAO, Y. P., LIU, T. H., XIAO, Y., CHEN, J., XIANG, H. D., WU, H. Y., LU, C. M., LV, B., ZHOU, Y. R., ZHANG, Y., DENG, D., CHEN, Y. J. alpha-Internexin: a novel biomarker for pancreatic neuroendocrine tumor aggressiveness. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, vol. 99 no. 5, s. E786-795. doi:10.1210/jc.2013-2874
185. SONG, Y. L., YU, R., QIAO, X. W., BAI, C. M., LU, C. M., XIAO, Y., ZHONG, D. R., CHEN, J., ZHAO, Y. P., ZHANG, T. P., SONG, T. T., GAO, H. L., WAN, Y. H., SHEN, L., CHEN, J., LV, B., HAO, J. J., ZHANG, Y., TANG, L., CHEN, Y. J. Prognostic relevance of UCH-L1 and alpha-internexin in pancreatic neuroendocrine tumors. *Sci Rep*, 2017, vol. 7 no. 1, s. 2205. doi:10.1038/s41598-017-02051-1

186. HU, R. M., HAN, Z. G., SONG, H. D., PENG, Y. D., HUANG, Q. H., REN, S. X., GU, Y. J., HUANG, C. H., LI, Y. B., JIANG, C. L., FU, G., ZHANG, Q. H., GU, B. W., DAI, M., MAO, Y. F., GAO, G. F., RONG, R., YE, M., ZHOU, J., XU, S. H., GU, J., SHI, J. X., JIN, W. R., ZHANG, C. K., WU, T. M., HUANG, G. Y., CHEN, Z., CHEN, M. D., CHEN, J. L. Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal axis and full-length cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, vol. 97 no. 17, s. 9543-9548. doi:10.1073/pnas.160270997
187. ZHOU, W., WANG, X., LI, L., FENG, X., YANG, Z., ZHANG, W., HU, R. Depletion of tubulin polymerization promoting protein family member 3 suppresses HeLa cell proliferation. *Mol Cell Biochem*, 2010, vol. 333 no. 1-2, s. 91-98. doi:10.1007/s11010-009-0208-0
188. ZHOU, W., LI, J., WANG, X., HU, R. Stable knockdown of TPPP3 by RNA interference in Lewis lung carcinoma cell inhibits tumor growth and metastasis. *Mol Cell Biochem*, 2010, vol. 343 no. 1-2, s. 231-238. doi:10.1007/s11010-010-0518-2
189. LI, Y., XU, Y., YE, K., WU, N., LI, J., LIU, N., HE, M., LU, B., ZHOU, W., HU, R. Knockdown of Tubulin Polymerization Promoting Protein Family Member 3 Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Cancer*, 2016, vol. 7 no. 10, s. 1189-1196. doi:10.7150/jca.14790
190. YE, K., LI, Y., ZHAO, W., WU, N., LIU, N., LI, R., CHEN, L., HE, M., LU, B., WANG, X., HU, R. Knockdown of Tubulin Polymerization Promoting Protein Family Member 3 inhibits cell proliferation and invasion in human colorectal cancer. *J Cancer*, 2017, vol. 8 no. 10, s. 1750-1758. doi:10.7150/jca.18943
191. ABS, R., VERHELST, J., MAITER, D., VAN ACKER, K., NOBELS, F., COOLENS, J. L., MAHLER, C., BECKERS, A. Cabergoline in the treatment of acromegaly: a study in 64 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, vol. 83 no. 2, s. 374-378. doi:10.1210/jcem.83.2.4556
192. COLAO, A., FERONE, D., MARZULLO, P., DI SARNO, A., CERBONE, G., SARNACCHIARO, F., CIRILLO, S., MEROLA, B., LOMBARDI, G. Effect of different dopaminergic agents in the treatment of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, vol. 82 no. 2, s. 518-523. doi:10.1210/jcem.82.2.3648
193. FREDA, P. U., KATZNELSON, L., VAN DER LELY, A. J., REYES, C. M., ZHAO, S., RABINOWITZ, D. Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-

- analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, vol. 90 no. 8, s. 4465-4473. doi:10.1210/jc.2005-0260
194. BEN-SHLOMO, A. Pharmacotherapy for acromegaly: future role for pasireotide? *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2015, vol. 44 no. 1, s. 35-41. doi:10.1016/j.ecl.2014.10.004
195. BEN-SHLOMO, A., MELMED, S. Pasireotide--a somatostatin analog for the potential treatment of acromegaly, neuroendocrine tumors and Cushing's disease. *IDrugs*, 2007, vol. 10 no. 12, s. 885-895. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18041687>
196. CORBETTA, S., BALLARE, E., MANTOVANI, G., LANIA, A., LOSA, M., DI BLASIO, A. M., SPADA, A. Somatostatin receptor subtype 2 and 5 in human GH-secreting pituitary adenomas: analysis of gene sequence and mRNA expression. *Eur J Clin Invest*, 2001, vol. 31 no. 3, s. 208-214. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264647>
197. JAQUET, P., SAVEANU, A., GUNZ, G., FINA, F., ZAMORA, A. J., GRINO, M., CULLER, M. D., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A., OUAFIK, L. H. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, vol. 85 no. 2, s. 781-792. doi:10.1210/jcem.85.2.6338
198. FERONE, D., DE HERDER, W. W., PIVONELLO, R., KROS, J. M., VAN KOETVELD, P. M., DE JONG, T., MINUTO, F., COLAO, A., LAMBERTS, S. W., HOFLAND, L. J. Correlation of in vitro and in vivo somatotropic adenoma responsiveness to somatostatin analogs and dopamine agonists with immunohistochemical evaluation of somatostatin and dopamine receptors and electron microscopy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, vol. 93 no. 4, s. 1412-1417. doi:10.1210/jc.2007-1358
199. TAKEI, M., SUZUKI, M., KAJIYA, H., ISHII, Y., TAHARA, S., MIYAKOSHI, T., EGASHIRA, N., TAKEKOSHI, S., SANNO, N., TERAMOTO, A., OSAMURA, R. Y. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor (SSTR) subtypes 2A and 5 in pituitary adenoma from acromegalic patients: good correlation with preoperative response to octreotide. *Endocr Pathol*, 2007, vol. 18 no. 4, s. 208-216. doi:10.1007/s12022-007-9004-0
200. PAWLIKOWSKI, M., PISAREK, H., KUNERT-RADEK, J., RADEK, M. Somatostatin receptors in GH-secreting pituitary adenomas--their relationship to the response to

- octreotide. *Endokrynol Pol*, 2008, vol. 59 no. 3, s. 196-199.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615392>
201. PISAREK, H., PAWLIKOWSKI, M., KUNERT-RADEK, J., WINCZYK, K. Does the response of GH-secreting pituitary adenomas to octreotide depend on the cellular localization of the somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5? *Endokrynol Pol*, 2010, vol. 61 no. 2, s. 178-181. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20464704>
202. WILDEMBERG, L. E., VIEIRA NETO, L., COSTA, D. F., NASCIUTTI, L. E., TAKIYA, C. M., ALVES, L. M., GADELHA, M. R. Validation of immunohistochemistry for somatostatin receptor subtype 2A in human somatotropinomas: comparison between quantitative real time RT-PCR and immunohistochemistry. *J Endocrinol Invest*, 2012, vol. 35 no. 6, s. 580-584. doi:10.3275/7906
203. PISAREK, H., KRUPINSKI, R., KUBIAK, R., BORKOWSKA, E., PAWLIKOWSKI, M., WINCZYK, K. Differential expression of somatostatin receptor subtype-related genes and proteins in non-functioning and functioning adrenal cortex adenomas. *Mol Med Rep*, 2011, vol. 4 no. 5, s. 963-969. doi:10.3892/mmr.2011.519
204. GABALEC, F., KOHOUT, A., LACO, J., DRASTIKOVA, M., BERANEK, M., NETUKA, D., MASOPUST, V., CESAK, T., CAP, J. No correlation between somatostatin 2 receptor expression analyzed by RNA in-situ hybridization and real-time qRT-PCR in clinically non-functioning pituitary adenomas. 15th European Congress of Endocrinology. 2013. doi:10.1530/endoabs.32.P834