

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

**Somatotropní adenomy hypofýzy u pacientů s akromegalií – stanovení  
míry exprese proteinů s potenciálním vlivem na terapeutickou odpověď**

Rigorózní práce

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Školitel specialista: MUDr. Jiří Soukup, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

RNDr. Mgr. Lenka Krbalová

## Prohlášení autora

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, 2023

.....

RNDr. Mgr. Lenka Krbalová

## Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli a spolupracovníkovi v jedné osobě MUDr. Jiřímu Soukupovi, Ph.D., bez kterého by tato práce nevznikla. Byl motorem a koordinátorem celého projektu, přičemž tato práce je jen malým dílkem celého komplexního výzkumu této problematiky. Dalším nedílným článkem našeho týmu byla MUDr. Monika Manethová, které rovněž patří velký dík za perfektní spolupráci.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za to, že se stal mým druhým školitelem a poskytl mi pomoc a cenné rady týkající se formálních náležitostí této práce.

A nakonec největší dík patří mému manželovi MUDr. Lukáši Krbalovi, Ph.D. za nekonečnou trpělivost, pomoc a podporu, bez které by tato práce vznikala jen stěží.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: RNDr. Mgr. Lenka Krbalová

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Školitel specialista: MUDr. Jiří Soukup, Ph.D.

Název rigorózní práce: **Somatotropní adenomy hypofýzy u pacientů s akromegalií – stanovení míry exprese proteinů s potenciálním vlivem na terapeutickou odpověď**

Akromegalie je vzácné onemocnění, projevující se širokou paletou různých příznaků (zvětšením akrálních částí těla, makroglosií, neuropatií, hypertenzí, kardiomyopatií aj.), které jednak zkracují život, jednak ve svých důsledcích značně snižují jeho kvalitu. Je způsobena zvýšenou sekrecí růstového hormonu v dospělosti. Příčinou této zvýšené sekrece bývá nejčastěji somatotropní adenom hypofýzy.

Léčba akromegalie vyžaduje ve většině případů komplexní přístup, jedná se o kombinaci chirurgického zásahu, radioterapie a farmakoterapie. Ve farmakoterapii se využívají především somatostatinová analoga (SSA). Jsou to látky, které po vazbě na somatostatinový receptor vykazují obdobné farmakodynamické účinky jako somatostatin. Jejich podání vede k poklesu sekreční aktivity tumoru a k redukci jeho objemu. Do první generace řadíme oktreotid a lanreotid (ty dnes představují nejrozšířenější medikamentózní léčbu akromegalie), do druhé pasireotid.

Terapeutická odpověď na SSA se mezi jednotlivými pacienty významně liší a prozatím neznáme přesné faktory, které by mohly jednoznačně předpovědět, jakou odpověď na léčbu SSA lze očekávat. Za nejvýznamnější ukazatel odpovědi se v současné době považuje exprese SSTR2.

Tato práce se věnuje podrobné analýze proteinů, které mohou mít vliv na účinnost léčby SSA, jedná se o 4 podtypy SSTR (SSTR1, 2, 3, a 5), D2DR a E-cadherin.

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: RNDr. Mgr. Lenka Krbalová

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Consultant Supervisor: MUDr. Jiří Soukup, Ph.D.

Title of the rigorous thesis: **Acromegaly in patients with somatotroph pituitary adenomas – determining the expression level of proteins with a potential influence on the therapeutic response**

Acromegaly is a rare disease manifested by a wide variety of symptoms (enlargement of the acral parts of the body, macroglossia, neuropathy, hypertension, cardiomyopathy etc.). These symptoms significantly decrease quality of life and shorten life span. It is caused by increased secretion of growth hormone in adulthood. The cause of this increased secretion is most often a somatotroph adenoma.

In most cases, the treatment of acromegaly requires a comprehensive approach. It is a combination of surgical intervention, radiotherapy and pharmacotherapy. Somatostatin analogues are mainly used in pharmacotherapy. These compounds have similar pharmacodynamic effects as somatostatin after binding to the somatostatin receptor. The administration of these compounds leads to a decrease in the secretory activity of the tumour and subsequently to the reduction of its volume. Octreotide and lanreotide belong to the first generation of SSA (these represent the most widely used medical treatment for acromegaly today) while pasireotide belongs to the second generation.

Therapeutic response to SSA varies significantly between individual patients. Exact factors that could clearly predict response to this treatment are not known. The expression of SSTR2 is currently considered to be the most important indicator of the response.

This thesis addresses detailed analysis of proteins that may affect the efficiency of SSA treatment, these are 4 subtypes of SSTR (SSTR1, 2, 3, and 5), D2DR and E-cadherin.

# Obsah

Prohlášení autora.....	2
Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk .....	8
1. Úvod.....	10
2. Cíle rigorózní práce .....	11
3. Teoretická část.....	12
3.1 Anatomie a histologie hypofýzy.....	12
3.1.1 Přední lalok hypofýzy.....	12
3.1.2 Zadní lalok hypofýzy.....	13
3.2 Fyziologická funkce hypothalamu a hypofýzy.....	13
3.3 Růstový hormon (somatotropin) .....	17
3.3.1 Receptory pro růstový hormon.....	17
3.3.2 Účinky růstového hormonu .....	18
3.3.3 Inzulinu podobné růstové faktory.....	19
3.3.4 Sekrece růstového hormonu.....	19
3.3.5 Fyziologie růstu .....	20
3.4 Hypothalamické statiny.....	21
3.4.1 Somatostatin .....	21
3.4.2 Dopamin.....	22
3.5 Choroby hypofýzy.....	23
3.5.1 Adenomy hypofýzy.....	23
3.5.2 Adenomy hypofýzy s produkcí somatotropinu .....	25
3.6 Akromegalie .....	26
3.6.1 Etiologie.....	26
3.6.2 Klinický obraz .....	26
3.6.3 Diagnostika.....	27
3.7 Endokrinologická léčba akromegalie .....	28
3.7.1 Léčiva používaná v terapii akromegalie .....	28
3.7.2 Klinické účinky léčby.....	31
3.7.3 Rezistence somatotropních adenomů hypofýzy na léčbu SSA .....	31
3.7.4 Obecné faktory ovlivňující odpověď na léčbu SSA.....	32
3.7.5 Odpověď na léčbu DA u somatotropních adenomů hypofýzy .....	34

4. Experimentální část.....	35
4.1 Registr RESET a data získaná z registru .....	35
4.2 Použité vzorky hypofyzárních adenomů .....	35
4.3 Metodika morfologického vyšetření.....	36
4.4 Imunohistochemické vyšetření tumorů .....	36
4.5 Hodnocení exprese jednotlivých SSTR, D2DR a E-cadherinu .....	37
4.6 Statistické zpracování dat .....	41
5. Výsledky .....	42
5.1 Obecné poznámky.....	42
5.2 Neoadjuvantní léčba SSA první generace a její vliv na hodnoty H-skóre studovaných proteinů.....	42
5.3 Vliv pohlaví na hodnoty H-skóre studovaných proteinů a na průměrný věk pacientů v době stanovení diagnózy.....	43
5.4 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi podskupinou SGST a non-SGST	43
5.5 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů v rámci podskupiny non-SGST .....	45
5.6 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi všemi subtypy hypofyzárních adenomů .....	46
5.7 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA.....	48
5.8 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů a věku mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA v podskupině SGST .....	50
5.9 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů a věku mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA v podskupině non-SGST .....	51
5.10 Souhrn výsledků .....	53
6. Diskuse .....	55
6.1 Obecné poznámky k hodnocení exprese proteinů SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu .....	55
6.2 Exprese proteinů SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu v kontextu ostatních studií.....	55
6.3 SGST versus ostatní podtypy adenomů hypofýzy (shrnutí) .....	58
7. Závěr.....	60
8. Seznam použité literatury .....	61

## Seznam zkratek

**ACTH** (*adrenocorticotropic hormone*) adrenokortikotropní hormon

**ADH** (*antidiuretic hormone*) antidiuretický hormon, též vazopresin

**ANOVA** (*analysis of variance*) analýza rozptylu

**CRH** (*corticotropin-releasing hormone*) kortikoliberin

**CT** (*computed tomography*) výpočetní tomografie

**DA** (*dopamine agonist*) dopaminergní agonista

**DAB** (*3,3'-diaminobenzidine*) 3,3'-diaminobenzidin

**DGST** (*densely granulated somatotroph tumours*) denzně granulované somatotropní tumory

**DM** (*diabetes mellitus*) úplavice cukrová, „cukrovka“

**DR** (*dopamine receptor*) dopaminový receptor

**D2DR** (*D2 dopamine receptor*) dopaminový receptor D2

**FSH** (*follicle-stimulating hormone*) folikuly stimulující hormon, též folitropin

**FÚP FNHK** Fingerlandův ústav patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové

**GHIH** (*growth hormone-inhibiting hormone*) somatostatin

**GHRH** (*growth hormone-releasing hormone*) somatoliberin

**GnRH** (*gonadotropin-releasing hormone*) gonadoliberin

**HIER** (*heat induced epitope retrieval*) odhalení epitopů pomocí vysoké teploty

**IGF-I** (*insulin-like growth factor I*) inzulínu podobný růstový faktor 1

**LAR** (*long acting repeatable*) dlouhodobé působení

**LH** (*luteinizing hormone*) luteinizační hormon, též lutropin

**MR** (*magnetic resonance*) magnetická rezonance

**PHA** (*plurihormonal adenoma*) plurihormonální adenomy hypofýzy



**Pit1** (*pituitary transcription factor 1*) hypofyzární transkripční faktor 1

**PRH** (*prolactin-releasing hormone*) hormon uvolňující prolaktin, též prolaktoliberin

**PRL** (*prolactin*) prolaktin

**RESET** registr selárních tumorů

**RT-qPCR** (*real time quantitative polymerase chain reaction*) kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

**SGST** (*sparsely granulated somatotroph tumours*) řídce granulované somatotropní tumory

**SLT** (*somatolactotroph tumours*) somatolaktotropní tumory

**SR** (*sustained release*) prodloužené uvolňování

**SSA** (*somatostatin analogues*) somatostatinová analoga

**SSTR1-5** (*somatostatin receptor 1-5*) somatostatinový receptor 1-5

**STH** somatotropní hormon, též somatotropin, též růstový hormon

**Stt** Studentův t-test

**TRH** (*thyreotropine-releasing hormone*) hormon uvolňující thyreotropin, též thyreoliberin

**TSH** (*thyroid-stimulating hormone*) thyreotropní hormon, též tyrotropin

$\mu \pm SD$  aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (*standard deviation*)

# 1. Úvod

Onemocnění akromegalií či gigantismem je staré jako lidstvo samo. Popisy a vyobrazení osob s tímto onemocněním se objevují v různých starověkých textech i obrazech, od papyrů starého Egypta, přes sumerské hliněné tabulky či starověkou literaturu řeckou a římskou až po bibli.

Nejznámějším gigantikem (možná gigantoakromegalikem) starověku byl zcela jistě Goliáš, popisovaný jako muž vysoký 6 loktů (cca 270 cm). V historii byli bohužel takto nemocní lidé většinou atrakcí cirkusových manéží, poutí a různých slavností.

Akromegalii poprvé popsal francouzský fyziolog a neurolog Pierre Marie v roce 1886 jako onemocnění charakterizované zvětšením horních a dolních končetin a hlavy. Název byl odvozen od řeckých slov *akros* (okrajový) a *megalos* (velký). V této době se také podařilo prokázat, že u akromegaliků je většinou za nadměrný růst zodpovědné zvětšení hypofýzy, zejména nádorové. Mechanismus vzniku této choroby se ale objasnit nepodařilo a akromegalie se nijak neléčila [1].

Teprve s rozvojem celkové anestezie a přesnějšími chirurgickými metodami se objevily první pokusy o operace mozku. Ty byly z počátku neúspěšné, v průběhu minulého století se ale díky objevu antibiotik a nových mikrooperačních technik podařilo úspěšnost významně zlepšit.

Milník v léčbě akromegalie přišel v roce 1968, kdy švédský chirurg Lars Leksell se svým kolegou dokončili vývoj gama nože, lékařského přístroje využívajícího v léčbě nádorů přesně cíleného gama záření (elektromagnetické ionizační záření, které má vyšší energii než záření rentgenové), které tak selektivně ničí nádorové buňky [2].

Farmakologická léčba je významnou součástí dnešního komplexního přístupu k léčbě pacientů s akromegalií. Od nejméně účinného dopaminergního agonisty kabergolinu, podávaného v tabletách, vývoj postoupil k somatostatinovým analogům (tlumícím sekreci růstového hormonu) podávaným depotními injekcemi (oktreotid, lanreotid, pasireotid), až k nejúčinnějšímu blokátoru receptorů pro růstový hormon pegvisomantu, podávanému subkutánně v denním intervalu. V poslední době dochází ke studiu nových lékových forem výše uvedených léčiv, jako jsou oktreotidové implantáty, perorální oktreotid, či nový blokátor receptorů pro růstový hormon ATL-1103 [3].

## 2. Cíle rigorózní práce

Předmětem této práce je charakteristika somatotropních adenomů hypofýzy u československého souboru pacientů s akromegalií, kteří byli zahrnuti v období let 2000-2015 do klinického registru RESET (registr selárních tumorů).

Konkrétně se bude jednat o:

- 1) Stanovení míry exprese jednotlivých podtypů somatostatinových receptorů (SSTR1, SSTR2, SSTR3 a SSTR5) ve zmiňovaných hypofyzárních adenomech (tyto somatostatinové receptory jsou cílem somatostatinových analog – SSA).
- 2) Stanovení míry exprese dopaminových receptorů D2 (D2 dopaminový receptor je cílem dopaminových agonistů – DA).
- 3) Stanovení míry exprese E-cadherinu (tento protein může mít vliv na citlivost hypofyzárních adenomů k somatostatinovým analogům).

Jedná se tedy o identifikaci a stanovení exprese těchto proteinů, které mohou hrát roli v odpovědi na farmakologickou léčbu somatotropních adenomů hypofýzy. Buď jsou sami cílem těchto léčiv, nebo citlivost k léčbě ovlivňují.

## 3. Teoretická část

### 3.1 Anatomie a histologie hypofýzy

Hypofýza je příčně oválné tělísko, růžovo šedavé barvy, zavěšené stopkou na spodině hypothalamu. Její délka je asi 10 mm, šířka 13 mm a výška 6 mm. Hmotnost se pohybuje mezi 0,5 – 0,7 g, u žen je žláza o něco hmotnější než u mužů, v těhotenství se dočasně zvětšuje. Hypofýza je uložena ve vyhloubení *sella turcica* klínové kosti, vložená do periostu a tvrdé pleny mozkové. Shora je z větší části krytá tvrdou plenu (*diaphragma sellae*), v ní je uprostřed otvor pro *infundibulum*.

Po obou stranách *sella turcica* je ve štěrbině mezi dvěma listy tvrdé pleny mozkové žilní splav (*sinus cavernosus*). Skrze tvrdou plenu a *sinus cavernosus* prochází vedle nervů *arteria carotis interna*, která je zdrojem tepen pro hypofýzu.

Podle anatomické úpravy, histologické struktury a podle funkce se hypofýza dělí na přední a zadní lalok. Ty pak obsahují další složky [4,5].

#### 3.1.1 Přední lalok hypofýzy

Přední lalok hypofýzy (*lobus anterior; adenohipophysis*) vznikl jako výchlipka ektodermu *stomodea*. Je větší a obsahuje více typů buněk produkujících hormony. V předním laloku rozlišujeme *pars distalis (pars principalis)* – přední největší část předního laloku, *pars intermedia* – úzký proužek tkáně na styku předního a zadního laloku, oddělený od předního laloku frontální úzkou štěrbinou, a *pars tuberalis* – část předního laloku pokrývající stopku hypofýzy a *infundibulum* [4,5].

##### **Pars distalis**

*Pars distalis* má vnitřní strukturu typickou pro endokrinní žlázu. Obsahuje více druhů buněk, které se podle afinity k barvivům dělí na buňky chromofobní (málo se barví běžnými histologickými barvivy) a buňky chromofilní (dobře se barví). Chromofilní buňky jsou vlastními producenty hormonů předního laloku a dále se dělí na acidofilní a bazofilní buňky [4,5,6,7].

Acidofilní buňky zahrnují dva druhy buněk produkujících hormony – somatotropní a laktotropní. Somatotropní buňky produkují somatotropin (růstový hormon), laktotropní buňky produkují prolaktin.

Bazofilní buňky zahrnují tři typy buněk (gonadotropní, thyrotropní, kortikotropní) produkující celkem čtyři hlavní hormony. Gonadotropní buňky produkují dva hormony (gonadotropiny) působící na pohlavní žlázy. Jde o folikuly stimulující hormon (folitropin) a luteinizační hormon (lutropin). Thyrotropní buňky jsou větší a polyedrické, uložené hlavně v centrálních okřscích pars distalis. Hormon jimi produkováný je thyrotropin. Kortikotropní buňky produkují polypeptidový hormon kortikotropin (adrenokortikotropní hormon) [6,7].

#### **Pars intermedia**

*Pars intermedia* je u člověka rudimentární úzká zóna tkáně na hranici předního a zadního laloku hypofýzy. Obsahuje bazofilní buňky – melanotropní buňky s malými sekrečními granuly, v nichž je vytvářen melanotropin (melanocyty stimulující hormon) [4,5,6,7].

#### **Pars tuberalis**

*Pars tuberalis* je tkáň předního laloku, která v tenké vrstvě obkládá *infundibulum*. Je to velmi cévnatý úsek, neboť zde začínají kapiláry sestupného hypofyzoportálního systému [4,5,6,7].

### **3.1.2 Zadní lalok hypofýzy**

Zadní lalok hypofýzy (*lobus posterior; neurohypophysis*) pochází z mezimozku. *Lobus nervosus* je označení pro vlastní zadní lalok, který je pokračováním útvaru zvaného *infundibulum*, nemá strukturu žlázy s vnitřní sekrecí a jeho hlavním obsahem jsou axony neuroendokrinních buněk, jejichž buněčná těla jsou uložena v hypothalamu [4,5,6,7].

## **3.2 Fyziologická funkce hypothalamu a hypofýzy**

Hypothalamus a hypofýza jsou anatomicky i funkčně propojené struktury, které tvoří součást neuroimunoendokrinních regulací. Obecně jsou zapojeny v kontrole dvou „H“ – homeostázy a hormonů.

V jádrech hypothalamu je produkována řada hormonů. Jedny ovlivňují sekreci hormonů z adenohipofýzy, další jsou s přímým účinkem na jiné tkáně. Hormony řídící sekreci hormonů z adenohipofýzy dělíme na liberiny (stimulují sekreci) a statiny

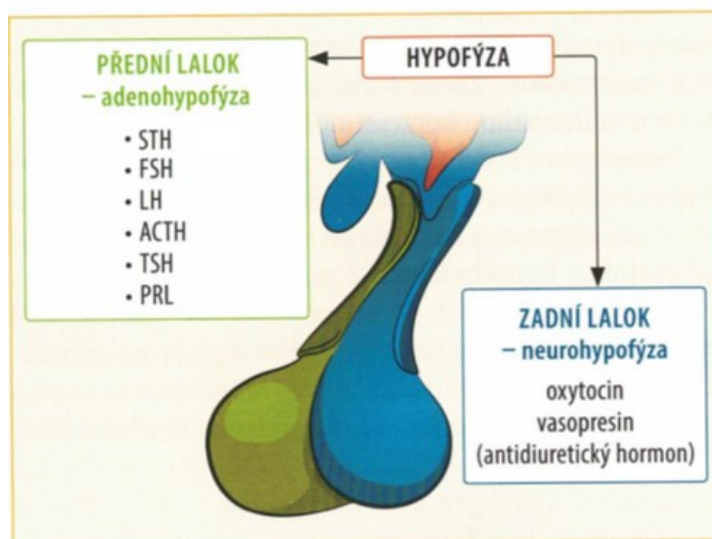
(inhibují sekreci). Pro správnou funkci je důležitá i pulzilita sekrece příslušných hormonů.

Mezi liberiny patří tyreoliberin (TRH), kortikoliberin (CRH), gonadoliberin (GnRH), somatoliberin (GHRH) a hormon uvolňující prolaktin (PRH). Mezi statiny řadíme somatostatin (GHIH) a dopamin [8,9].

Hypofýza je žláza s vnitřní sekrecí, někdy nazývaná hlavní žlázou, neboť mimo vlastní sekreci kontroluje sekreci hormonů v ostatních žlázách v celém těle. Hypofýza je složena ze dvou laloků – přední adenohipofýzy a zadní neurohipofýzy (obrázek 1).

Adenohipofýza je zodpovědná za sekreci růstového hormonu (STH), folikuly stimulujícího hormonu neboli folitropinu (FSH), luteinizačního hormonu neboli lutropinu (LH), adrenokortikotropního hormonu (ACTH), tyreotropinu (TSH) a prolaktinu (PRL). Sekrece těchto hormonů je regulována z hypothalamu, který vysílá signál v podobě liberinů.

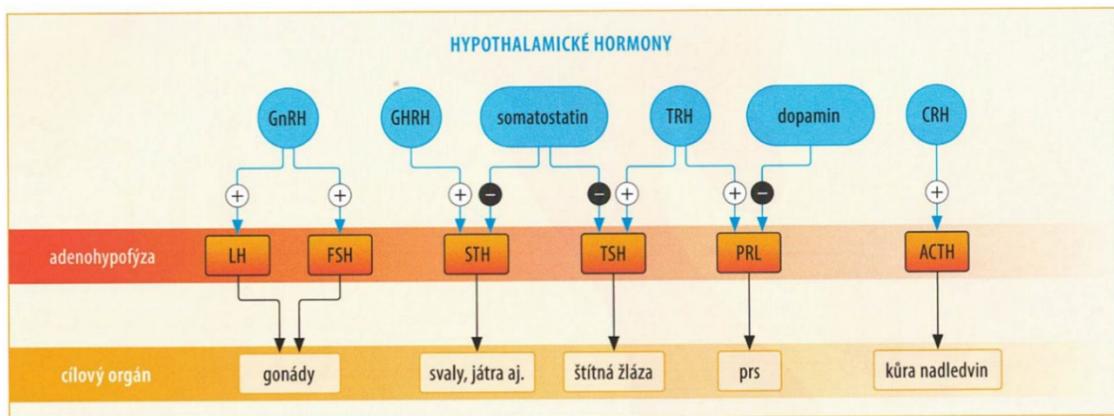
Neurohipofýza je zodpovědná za sekreci dvou hormonů, které jsou syntetizovány v jádrech hypothalamu a do neurohipofýzy dopraveny portálním řečištěm. Oxytocin hraje roli v době porodu a laktace a má svou úlohu v sociálním chování a cítění. Vasopresin (ADH – antidiuretický hormon) má za úkol zejména hospodaření s vodou a regulaci krevního tlaku.



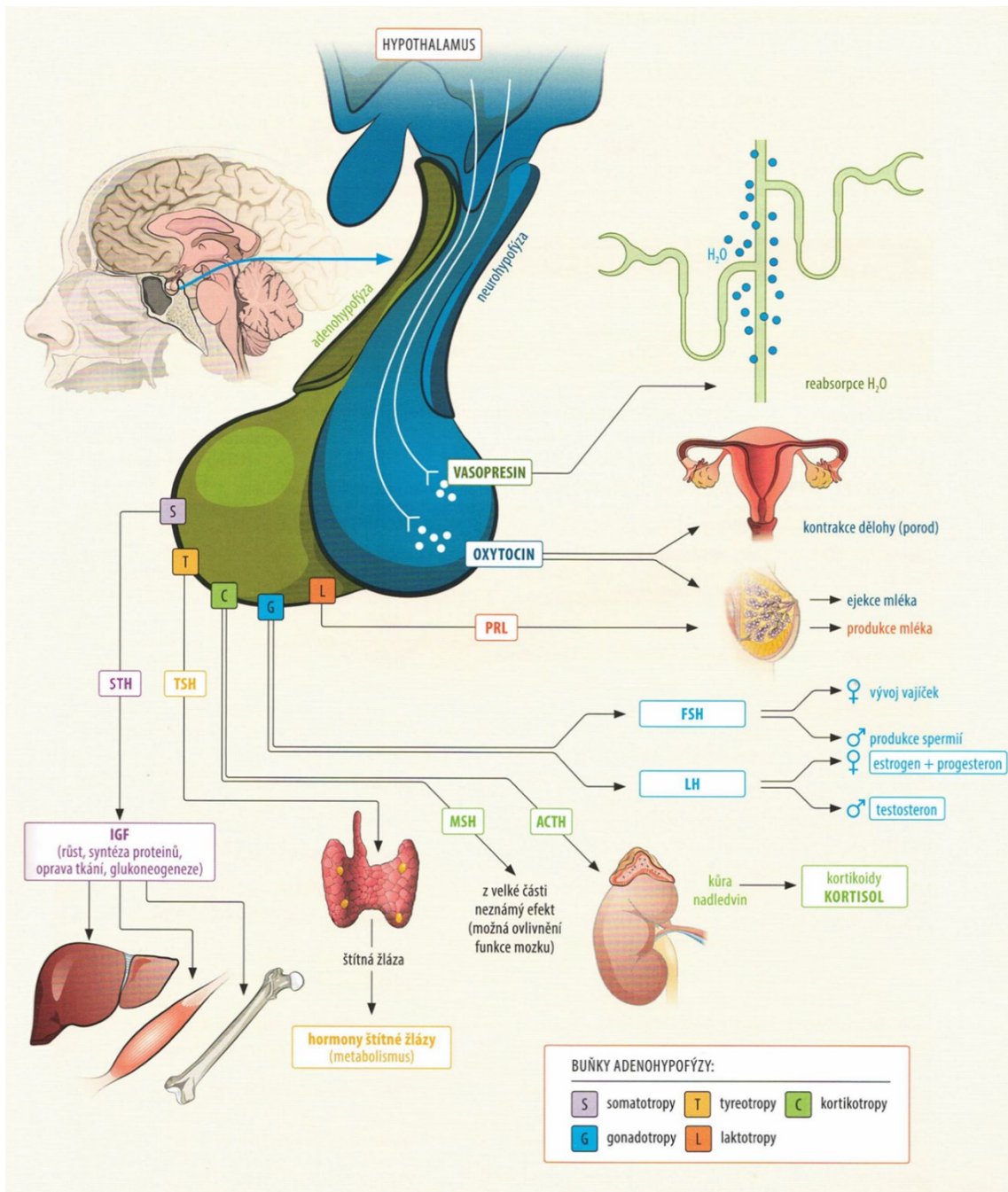
**Obrázek 1.** Laloky hypofýzy s hormony tvořícími se v příslušné oblasti; STH – růstový hormon, FSH – folikuly stimulační hormon, LH – luteinizační hormon, ACTH – adrenokortikotropní hormon, TSH – štítnou žlázu stimulující hormon, PRL – prolaktin. Převzato a upraveno dle [8].

Hormony hypofýzy jsou uvolňovány do krevního oběhu a ovlivňují vzdálené tkáně i další endokrinní žlázy. Z těchto periferně uložených endokrinních žláz jsou pak uvolňovány další hormony. Jejich hladina v periferní krvi ovlivňuje na principu negativní zpětné vazby sekreci statinů a liberinů v hypothalamu, které řídí sekreci hormonů z adenohypofýzy a neurohypofýzy [8,10].

Přehledně je celá osa hypothalamus – hypofýza – periferní žláza znázorněna na následujících dvou obrázcích (2 a 3).



**Obrázek 2.** Vztah mezi hypothalamickými liberiny/statiny, hypofýzou a cílovými orgány. Převzato a upraveno dle [8].



**Obrázek 3.** Přehledné zobrazení osy hypothalamus-hypofýza-periferní žláza s příslušným efektem. Převzato a upraveno dle [8].



### 3.3 Růstový hormon (somatotropin)

Dlouhé raménko lidského chromozomu 17 obsahuje shluk pěti genů pro STH-hCS. Jeden z genů, *hGH-N* (N jako normální), kóduje formu růstového hormonu (STH), přítomnou v největším množství. Druhý gen *hGH-V* (V jako variantní) kóduje variantní formu STH. Dva geny kódují hCS a pátý je zřejmě pseudogen pro hCS.

„Normální“ STH, produkt *hGH-N*, představuje asi 75 % STH v krvi. Pro svou molekulovou hmotnost 22 kDa se označuje též jako 22 K STH. Gen *hGH-V* se exprimuje hlavně v placentě, produkuje variantní STH (20 K STH), jehož větší množství se v krvi objevuje jen v těhotenství. Fyziologický význam toho, že existuje několik forem STH, není znám.

STH se v plazmě váže na protein, který je velkým fragmentem extracelulární domény receptoru pro STH. Zdá se, že tento protein vzniká u lidí štěpením receptorů pro STH ve tkáních. Vázána je asi polovina STH, a tak vzniká rezerva, která může vyrovnávat velké výkyvy v sekreci STH. STH se rychle metabolizuje a jeho poločas v krvi u lidí je 6-20 min [9,11].

#### 3.3.1 Receptory pro růstový hormon

Receptor pro růstový hormon je protein o 620 aminokyselinách s velkou extracelulární částí, transmembránovou doménou a velkou částí molekuly v cytoplasmě. STH má dvě vazebná místa pro receptory, a když se váže na jednu receptorovou podjednotku, druhé vazebné místo přitáhne druhou podjednotku, takže vzniká homodimer. Tato dimerizace je pro aktivaci receptoru nezbytná.

STH má v těle rozsáhlé účinky a tak, i když dosud není možno korelovat účinky intracelulární a celotělové, nepřekvapuje, že STH, podobně jako inzulin, aktivuje mnoho různých intracelulárních kaskád, např. JAK2-Stat. JAK2 je členem Janusové rodiny cytoplazmatických tyrozinkináz. Stat (signálové transducery a aktivátory transkripce) jsou rodinou inaktivních cytoplazmatických transkripčních faktorů, které po fosforylaci JAK-kinázami migrují do jádra a aktivují různé geny. Cesty JAK-Stat též zprostředkovávají účinky prolaktinu a různých růstových faktorů [9,12].

### 3.3.2 Účinky růstového hormonu

#### Účinky na růst

U mladých zvířat, u kterých ještě růstové štěrbiny nejsou srostlé s diafyzami dlouhých kostí, se růst inhibuje hypofyzektomií a stimuluje STH. Zrychluje se tvorba chrupavky (chondrogenese), a jak se chrupavčité růstové štěrbiny rozšiřují, ukládá se více kostní matrix na koncích dlouhých kostí. Tak se zvyšuje růst a při protražovaném působení vzniká gigantismus (obří vzrůst). Když se epifyzární štěrbiny zavřou, není nadále možný růst do délky. STH (pokud je v nadbytku) pak vyvolává charakteristické deformity kostí i měkkých tkání, označované u lidí jako akromegalie. Zvětšují se rozměry většiny orgánů (hl. jater). STH však může ovlivnit i endokrinní žlázy a uvádí se, že působí synergicky s ACTH při zvyšování velikosti nadledvin [9].

#### Účinky na proteinový a elektrolytový metabolismus

STH je proteoanabolický a způsobuje pozitivní bilanci dusíku a fosforu. Zvyšuje hladinu fosfátů v plazmě a snižuje hladiny dusíku, močoviny a aminokyselin v krvi. U dospělých lidí s deficitem STH vyvolá rekombinantní STH zvýšení beztukové tělesné hmoty a snížení obsahu tuků v těle. Současně se zvyšuje rychlost metabolismu a klesá hladina plazmatického cholesterolu. Zvyšuje se resorpce  $\text{Ca}^{2+}$  v trávicím ústrojí. Exkrece  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  se snižuje nezávisle na nadledvinách, patrně proto, že se tyto elektrolyty směřují od vylučování v ledvinách do rostoucích tkání [9,11].

#### Účinky na metabolismus cukrů a tuků

STH je diabetogenní, protože zvyšuje výdej glukózy z jater a má ve svalech anti-inzulinový účinek. Je ketogenní, protože zvyšuje hladiny volných mastných kyselin v krvi. Zvýšení plazmatických hladin volných mastných kyselin (které nastává až po několika hodinách po podání STH) poskytuje dostupný zdroj energie pro tkáně za hypoglykémie, při hladovění nebo po působení stresových podnětů. STH nestimuluje přímo  $\beta$ -buňky pankreatu, ale zvyšuje schopnost pankreatu reagovat na inzulinogenní podněty (např. arginin nebo glukózu). To je další cesta, kterou STH stimuluje růst, protože inzulin má proteoanabolický účinek [9,12].

### 3.3.3 Inzulinu podobné růstové faktory

Účinek STH je zprostředkován především inzulinu podobnými růstovými faktory (somatomediny). Jedná se o polypeptidové růstové faktory, které jsou secernované po stimulaci STH, a které působí na mnohé tkáně a orgány.

Hlavními (a u lidí pravděpodobně jedinými) somatomediny v krvi jsou inzulinu podobný růstový faktor I (IGF-I, somatomedin C) a inzulinu podobný růstový faktor II (IGF-II, somatomedin A). Tyto faktory jsou úzce příbuzné inzulinu a váží se na proteiny plazmy, což prodlužuje jejich poločas v krvi. Protein 3 vázající IGF (IGFBP-3) odpovídá asi za 95 % vazby v krvi. Receptor pro IGF-I se velmi podobá receptoru inzulinovému a pravděpodobně používá stejný intracelulární mechanismus jako receptor pro inzulin.

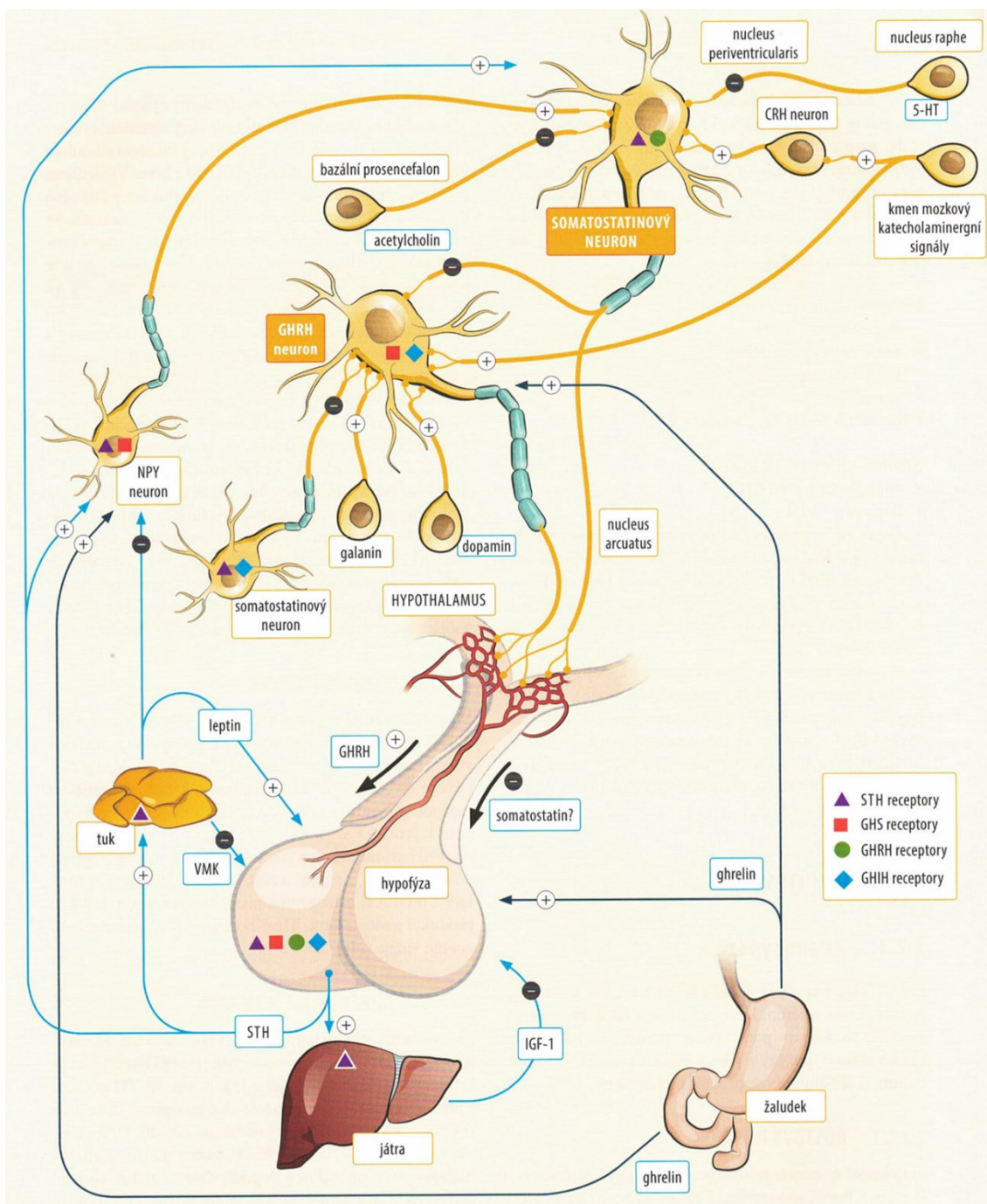
IGF-I má výrazný stimulační účinek na růst, jeho koncentrace v krvi stoupá v dětství a vrcholí v době puberty, pak klesá až k nízkým hodnotám ve stáří [9].

### 3.3.4 Sekrece růstového hormonu

Sekrece STH je řízena hypothalamem, ten secernuje do portální hypofyzární krve somatoliberin (hormon vyvolávající sekreci STH) a dále somatostatin (hormon inhibující sekreci STH). V hypofýze dospělých i dětí jsou velká množství STH, jehož sekrece probíhá ve výrazných a rychlých pulzech a podléhá zpětnovazební kontrole. STH zvyšuje hladiny IGF-I v krvi, a IGF-I má pak přímý inhibiční účinek na sekreci STH adenohipofýzou [8, 9].

Bazální hladiny STH v krvi zdravých dospělých lidí se pohybují od 0 do 4 ng/ml. Jednotlivé vrcholy sekrece nastávají nepravidelně během dne, ale průměrná hladina v plazmě se v průběhu 24 h zvyšuje. Mezi podněty, které zvyšují sekreci STH patří stavy, jako jsou hypoglykémie, hladovění nebo stres.

Sekrece STH je inhibována kortizolem, volnými mastnými kyselinami a medroxyprogesteronem, a naopak se zvyšuje po podání L-DOPA (stimuluje uvolňování dopaminu a noradrenalinu v mozku). Stimulační účinky noradrenalinu a dopaminu jsou centrální. U dopaminu však bylo zjištěno, že má současný účinek inhibiční, vykonávaný přes D<sub>2</sub>-receptory a nastávající přímo v somatotropech [9,12]. Schéma osy STH je přehledně znázorněno na obrázku 4.



**Obrázek 4.** Schéma osy STH. Sekrece STH je stimulována somatokrininem (GHRH) a inhibována somatostatinem (GHIH). Zpětnovazebně je funkce regulována inzulinu podobným růstovým faktorem 1 (IGF-1) a volnými mastnými kyselinami (VMK). Zpětnou vazbou působí i samotný STH, kdy stimuluje produkci somatostatinu v periventrikulárních jádrech. Nepřímo je sekrece STH ovlivněna neuropeptidem Y (NPY), jehož sekrece je ovlivněna hladinami ghrelinu, leptinu a STH. V sekreci STH hrají roli dle nepřímých dat i další působky. Převzato a upraveno dle [8].

### 3.3.5 Fyziologie růstu

Růst je komplexním fenoménem, který je ovlivněn nejen STH a somatomediny, ale také hormony štítné žlázy, androgeny, estrogeny, glukokortikoidy a inzulinem. Působí

na něj ovšem i genetické faktory a závisí na stavu výživy. Růst je za normálních podmínek provázen uspořádaným sledem maturačních změn a patří k němu přibývání proteinů v tkáních a mimo zvýšení váhy i zvětšování délky a ostatních rozměrů.

U lidí jsou dvě periody akcelerace růstu, první v raném dětství a druhá v pozdní pubertě. První období zrychleného růstu je zčásti pokračováním fetální růstové periody. Druhé růstové zrychlení v pubertě je způsobeno STH, androgeny a estrogeny. Následná zástava růstu je působena hlavně uzavřením růstových štěrbin účinkem estrogenů [9,10].

## 3.4 Hypothalamické statiny

Jedná se o působky tvořené v hypothalamu, které inhibují sekreci adenohypofyzárních hormonů. Hlavními jsou somatostatin a dopamin [9].

### 3.4.1 Somatostatin

Somatostatin je peptidický hormon, produkováný hypothalamem, kde byl také nejdříve popsán jeho inhibiční účinek na uvolnění STH, dále je produkován buňkami trávicího traktu a  $\delta$ -buňkami Langerhansových ostrůvků. V endokrinním pankreatu inhibuje sekreci inzulínu a dalších pankreatických hormonů a v trávicím ústrojí je důležitým inhibičním gastrointestinálním hormonem. Sekrece somatostatínu se zvyšuje se zvyšující se hladinou glukózy, výdej je dále stimulován aminokyselinami z potravy, některými regulačními peptidy zažívacího traktu a také glukagonem [9,13].

Somatostatin je syntetizován jako presomatostatin a následně je štěpen na dva polypeptidy: somatostatin 14 (složen ze 14 aminokyselin) a somatostatin 28 (složen z 28 aminokyselin). Oba se nacházejí společně v tkáních a oba jsou biologicky aktivní [9]. Somatostatin 14 se na hypothalamo-hypofyzární regulaci podílí největší měrou. Je syntetizován neurony hypothalamu, konkrétně v *nucleus periventricularis anterior*, odtud dále putuje přes *eminentia mediana* do portálního oběhu hypofýzy [14,15].

#### 3.4.1.1 Somatostatinové receptory

Somatostatinové receptory existují v pěti izoformách (SSTR1-5). Jedná se o membránové receptory zprostředkující buněčnou signalizaci po vazbě somatostatínu. Signalizační dráhy jednotlivých receptorů se do jisté míry odlišují, obecně však lze říci, že jejich aktivace inhibuje sekreci a proliferaci nádorových buněk (všechny jsou spojeny

s G proteiny a tlumí adenylátcyklázu). V tomto ohledu jsou nejvýznamnější SSTR2 a SSTR5, neboť představují vazebný cíl pro farmakologicky aktivní somatostatinová analoga, jež se užívají v terapii vybraných adenomů hypofýzy. Studie ukazují relativně konzistentní údaje o expresi SSTR2 a SSTR5 v somatotropních adenomech a thyreotropních adenomech, dále bývá exprese přítomna v gonadotropních adenomech a v menší míře i v dalších subtypech adenomů. Imunohistochemické vyšetření exprese receptorů lze provést před zvažovanou terapií somatostatinovými analogy, tento postup má však v současnosti pouze experimentální charakter vhodný spíše pro účely klinických studií než reálný klinický význam. Přestože existuje množství různých, především polyklonálních protilátek proti somatostatinovým receptorům, nejlepší laboratorní výsledky jsou dosahovány s monoklonálními protilátkami, které v porovnání s polyklonálními protilátkami jeví vyšší senzitivitu i specificitu. Signifikantní pozitivita těchto protilátek má v histologických řezech membránovou lokalizaci [8,9].

### 3.4.2 Dopamin

Dopamin se svou chemickou strukturou řadí do skupiny katecholaminů. Je odvozen od aminokyseliny tyrosinu a je tvořen v cytosolu dopaminergních neuronů centrálního i periferního nervového systému. V hypothalamo-hypofyzárním systému je dopamin syntetizován především neurony v *nucleus arcuatus* a *nucleus periventricularis*. Dopamin putuje axony neuronů z *nucleus arcuatus* do *eminetia mediana*, odkud je uvolňován do perikapilárních prostor a dále putuje portální cirkulací do adenohipofýzy [14,16,17].

#### 3.4.2.1 Dopaminové receptory

V lidském těle existuje celkem pět typů dopaminových receptorů (DR1-DR5). Jejich struktura odpovídá ostatním receptorovým proteinům asociovaným s G proteinem. D2 dopaminový receptor je nejčastěji a nejvíce exprimovaný dopaminový receptor v somatotropních adenomech hypofýzy a jeho exprese podmiňuje farmakologickou odpověď na dopaminová analoga. Exprese D2 dopaminového receptoru v somatotropních adenomech hypofýzy je v porovnání s tkání normální hypofýzy nižší [14,18,19].

## 3.5 Choroby hypofýzy

Mezi choroby hypofýzy řadíme adenomy hypofýzy a potažmo akromegalii, hypopituitarismus, prolaktinomy, adenomy z thyreotropních buněk, adenomy z gonadotropních buněk, Cushingův syndrom/Cushingovu chorobu a lymfocytární hypofyzitidu [20].

Pro tuto práci jsou stěžejní první dvě jednotky, tedy adenomy hypofýzy a akromegalie, a proto se budeme blíže věnovat pouze jim.

### 3.5.1 Adenomy hypofýzy

Zdaleka nejčastějším expanzivním procesem v dospělosti v oblasti hypofýzy jsou hypofyzární adenomy. Nalézají se u 10 až 27 % veškeré populace. Jde většinou pouze o adenomy malé, které nezpůsobují žádné obtíže. Adenomy naštěstí jen výjimečně dorůstají do rozměrů, kdy vyvolávají klinickou symptomatologii. V poslední době se množí nálezy i malých asymptomatických adenomů, které dosud unikaly pozornosti. Je to tím, že se v diagnostice hlavových onemocnění čím dál více používá CT a MR a adenomy se přitom diagnostikují jako náhodný nález. Proto se také nazývají incidentalomy [20].

Až u 90 % hypofyzárních adenomů lze v jejich buňkách prokázat imunohistochemicky a elektronopticky hormonální tvorbu. Neznamená to ovšem, že se tato hormonální tvorba vždycky uplatní. Někdy se hormony sice v buňkách adenomu tvoří, ale nejsou secernovány do zevního prostředí a dochází k jejich lyzomálnímu rozkladu (tzv. tiché adenomy). Jindy je hormonální tvorba jen nepatrná, takže se laboratorně ani klinicky nezjistí. Řada adenomů tvoří hormony, které nepatří mezi tzv. klasické hypofyzární hormony (např. neurotensin, cholecystokinin, galanin, VIP či angiotenzin). Ani ty se při sekreci z hypofýzy funkčně neuplatní. Všem těmto adenomům, i když jsou vlastně sekreční, říkáme afunkční adenomy.

Mezi hyperfunkční adenomy hypofýzy počítáme adenomy se sekrecí růstového hormonu působící v dospělosti akromegalii, před pubertou gigantismus a v době kolem puberty gigantoakromegalii, dále adenomy se sekrecí prolaktinu (prolaktinomy) působící poruchu gonádové funkce, adenomy se sekrecí ACTH působící centrální formu Cushingova syndromu, vzácné adenomy s tvorbou TSH a gonadotropinomy se sekrecí kompletních hormonů LH a FSH či jejich řetězců. Časté jsou adenomy se smíšenou sekrecí

dvou nebo více hormonů, ale obvykle sekrece jednoho hormonu převažuje a určuje klinický obraz. Nejčastější je kombinace STH a prolaktinu [21].

### 3.5.1.1 Etiologie

Příčinou vzniku hypofyzárních adenomů jsou genové mutace některých proteinů postižených buněk. Nejznámější mutací je mutace  $\alpha$ -řetězce membránového G proteinu u nemocných s akromegalií. Za normálních okolností se tento protein aktivuje přechodně hypothalamickým somatoliberinem. Jeho mutace (kterou vzniká onkogen *gsp*) však udržuje buňku v trvale aktivovaném stavu. Kromě vzniku patologických buněk zde však musí být ještě faktory, které umožňují jejich množení, a tím růst patologické tkáně (např. vlivy hormonálního prostředí).

Adenomy mohou dorůst do určité velikosti a dále se nezvětšovat. K další stimulaci růstu může dojít až po mnoha letech. Jen málo z nich jsou tzv. invazivní adenomy, které dosahují velkých rozměrů (gigantické adenomy) a prorůstají až do různých částí mozku či do oblasti faryngu. Tyto invazivní adenomy sice svým růstem připomínají karcinomy, ale nemetastazují. Metastazující karcinomy vycházející z hypofýzy jsou nesmírně vzácné, ale existují. Metastázy jsou většinou lokalizovány na meningách a intracerebrálně, jen výjimečně mimo oblast hlavy.

Velmi často dochází v adenomech ke krvácení. Toto krvácení je nejčastěji jen malé, postihuje pouze část adenomu a proběhne obvykle asymptomaticky. Větší krvácení mohou prokrvácet celý adenom, a tím jej vlastně autodestrukčně odstranit. Někdy je však krvácením postižena i sousední zdravá hypofyzární tkáň, takže vznikne hypopituitarismus. Tato větší krvácení se projeví obvykle krátkou, ale intenzivní cefaleou. Masivní krvácení (tzv. pituitární apoplexie) jsou naštěstí vzácná. Krev proniká do subarachnoideálních prostorů, do mozkových komor a ničí i mozkovou tkáň. Jde o život ohrožující stav, který vyžaduje okamžitý neurochirurgický zásah [20,21].

### 3.5.1.2 Klinický obraz

Jen některé z expanzivních procesů prorůstají do zdravé hypofýzy a způsobují hypopituitarismus. Většina z nich se manifestuje teprve při extraselárním růstu. Nejčastějším příznakem je tlak na zrakovou dráhu s poruchami zraku. Optické chiasma je totiž uloženo před hypofyzární stopkou a u nezvětšených hypofýz bývá vzdálenost od



diafragmatu 5-10 mm. Expanzivně rostoucí nádor může poškodit zrakovou dráhu a vést k výpadkům zorného pole. Nemocný obvykle nehlásí omezení pohledu do stran, ale zhoršení zraku [20,21].

### 3.5.2 Adenomy hypofýzy s produkcí somatotropinu

Adenomy hypofýzy s produkcí somatotropinu neboli somatotropní adenomy hypofýzy představují 20 % všech adenomů hypofýzy. Vyznačují se expresí Pit1 a somatotropinu, navíc může být exprimován prolaktin nebo  $\beta$ TSH. Dle WHO klasifikace se dělí na denzně granulované, řídké granulované, somatolaktotropní, mammosomatotropní, plurihormonální a acidofilní z kmenových buněk [14,22]. Zastoupení jednotlivých podtypů u pacientů s akromegalií je shrnuto v tabulce 1.

**Tabulka 1.** Prevalence jednotlivých podtypů somatotropních adenomů hypofýzy u pacientů s akromegalií. Převzato a upraveno dle [14,22].

Podtyp somatotropního adenomu hypofýzy	Prevalence u pacientů s akromegalií
Denzně granulovaný	40 %
Řídce granulovaný	30 %
Somatolaktotropní	20 %
Mammosomatotropní	5 %
Plurihormonální	5 %
Acidofilní z kmenových buněk	<1 %

U **denzně granulovaných somatotropních adenomů hypofýzy (DGST)** se perinukleárně nacházejí intermediární cytokeratinová filamenta, dále je přítomna objemná eosinofilní cytoplazma a silná imunohistochemická pozitivita STH [14]. Charakteristickým znakem **řídké granulovaných somatotropních adenomů hypofýzy (SGST)** je přítomnost fibrózních tělísek ve více než 70 % buněk. Tyto lze identifikovat v histologických řezech. Jejich cytoplazma je chromofobní a mají variabilní intenzitu positivity STH. Ve srovnání s ostatními somatotropními adenomy hypofýzy se častěji vyskytují u mladších pacientů, mají nižší expresi somatostatinových receptorů, která je pravděpodobně příčinou jejich agresivnějšího biologického chování a horší klinické odpovědi na léčbu somatostatinovými analogy [14,22,23]. U **somatolaktotropních adenomů hypofýzy** je produkce somatotropinu doplněna prolaktinem a každý hormon je tvořen jinou populací buněk. Nejedná se o agresivní tumory [14,22-24]. U **mammosomatotropních adenomů hypofýzy** je produkce somatotropinu rovněž doplněna o

prolaktin, ale v tomto případě jsou oba produkovány jednou buňkou. Tyto adenomy se nechovají agresivně [14,22-24]. Somatolaktotropní a mammosomatotropní adenomy hypofýzy se označují společnou zkratkou SLT. **Plurihormonální adenomy hypofýzy** produkují somatotropin, prolaktin a  $\beta$ TSH. V elektronovém mikroskopu je charakteristický hyperplastický Golgiho aparát a jaderné inkluze (tzv. *sferidia*). Tyto tumory mají spíše agresivnější chování [14,25,26]. **Acidofilní adenomy hypofýzy z kmenových buněk** mají typicky eosinofilní granulární cytoplazmu, místy s vakuolami a zmnoženými mitochondriemi. Produkují především prolaktin a v menší míře somatotropin. Vykazují klinicky agresivní chování [14,22,27,28].

## 3.6 Akromegalie

### 3.6.1 Etiologie

Akromegalie je způsobena zvýšenou sekrecí STH v dospělosti. Gigantismus se rozvíjí v případě, že nadbytek růstového hormonu působí před uzavřením růstových chrupavek. Gigantoakromegalie vzniká tehdy, když hypersekrece růstového hormonu začne před pubertou, ale pokračuje i po ní. Příčinou je většinou sekrece STH z hypofyzárního adenomu. Jen velmi vzácně se objevuje syndrom s ektopickou sekrecí somatoliberinu (GH-RH) z karcinomů (především pankreatu a plic) a autonomní sekrece GH-RH z hypothalamických hamartomů, které způsobí hyperplazii somatotropních buněk hypofýzy. Akromegalie je vzácné onemocnění. Odhadujeme, že v České republice jím trpí asi 400 nemocných [9,20].

### 3.6.2 Klinický obraz

Vedoucím příznakem je zvětšení akrálních částí těla. Vzniká obvykle pomalu, a proto je pro nemocného a blízké okolí nenápadné. Nedochozí také k rovnoměrnému zvětšení všech aker. U některých nemocných jsou více znatelné změny v obličeji, u jiných na ruce („kolíkovité“ prsty) či na nohou (nemocní mění boty, protože jsou jim úzké, nikoliv krátké), většinou bývá nápadná makroglosie a rozestup zubů s jejich zvýšenou kazivostí. Nemocní se zvýšeně potí. Na akromegalii někdy upozorní revmatolog nebo ortoped – u některých nemocných jsou přítomny artralgie, lumbalgie a další spondylogenní bolesti. K neurologovi se nemocní dostanou se špatně ovlivnitelnými bolestmi hlavy a akromegalickou neuropatií, u části žen se záhy manifestuje amenorea

(obvykle při současné hypersekreci prolaktinu), někdy je záchytným bodem ambulance diabetologa (diabetes vzniká asi u 20 % nemocných, u většiny je však zhoršená glukózová tolerance). Nemocní s akromegalií mají také častěji hypertenzi. Hlavní příčinou zkrácené střední délky života (asi o 10 let) je však kardiomyopatie, která vede k srdečnímu selhání nebo k fatálním poruchám rytmu. Myopatie se týká též kosterního svalstva a projevuje se v pokročilých stádiích nemoci svalovou slabostí (na počátku onemocnění bývá naopak svalová síla zvýšena, STH je zneužíván dokonce k doping u sportovců). Tvorba střevních polypů je příčinou zvýšené incidence karcinomu tlustého střeva. Téměř vždy je přítomna nodózní struma. Velmi často se setkáváme se syndromem spánkové apnoe a syndromem karpálního tunelu. Stejně jako jiné adenomy může adenom patologicky secernující STH působit svým růstem do okolí. Akromegalie tak jednak zkracuje život, jednak ve svých důsledcích značně snižuje jeho kvalitu. Proto by měla být včas, tj. ještě před rozvinutím ireverzibilních tkáňových změn a nárůstem adenomu do obtížně odstranitelných rozměrů, rozpoznána a léčena [9,20].

### 3.6.3 Diagnostika

Základním laboratorním vyšetřením je stanovení STH v séru. Jednorázové vyšetření však není, s výjimkou vysoce aktivních forem akromegalie, dostatečné. STH se vylučuje pulsním způsobem a normální a patologické hodnoty se tak mohou překrývat. Na rozdíl od zdravých neklesne sekrece STH u akromegalií nikdy na tzv. bazální hodnoty – pod 1  $\mu\text{g/l}$ . V současné době se orientujeme o aktivitě akromegalického procesu podle koncentrace IGF-I, jehož koncentrace je v séru bez větších diurnálních výkyvů. Jeho tkáňová tvorba je regulována STH, přesto to však není zcela specifické vyšetření (koncentrace IGF-I závisí též na nutrici a funkci štítné žlázy). Sekrece IGF-I klesá od puberty do stáří, a proto je rozpětí normálních hodnot věkově závislé. Současně vyšetřujeme i prolaktin (hyperprolaktinémie doprovází asi 1/3 akromegalií) a ověřujeme funkci hypofýzy. O velikosti adenomu se orientujeme vyšetřením MR, která může přesněji než CT znázornit vztah k okolním strukturám, především zřetelně dráze, což bývá důležitá informace pro operátora [20].

## 3.7 Endokrinologická léčba akromegalie

Léčba akromegalie vyžaduje ve většině případů komplexní přístup s využitím více modalit, protože operace odstraní hypersekreci STH asi jen v polovině případů. Jejím cílem je odstranění nebo zmenšení adenomu hypofýzy, odstranění patologické sekrece STH, normalizace IGF-1 do pásma hodnot pro příslušný věk, blokáda účinku STH, odstranění nebo zmírnění symptomů akromegalie, odstranění nebo redukce metabolických komplikací akromegalie (např. DM) a zachování hypofyzárních funkcí (je-li to možné).

Postavení farmakoterapie je v léčbě akromegalie v převážné většině případů adjuvantní, a to obvykle po operaci a radiochirurgii/radioterapii do rozvoje plného efektu ozáření. Jako primoterapie se aplikuje farmakoterapie podstatně méně často. Jedná se o případy, kdy je operace kontraindikována nebo odmítnuta. Dále jako příprava před operací (zmírnění otoku laryngu a zmenšení makroglosie, zlepšení obstrukční apnoe a kardiální dysfunkce). Při dobré odpovědi na kabergolin u mírně aktivní akromegalie, SSA jsou někdy podávána jako primoterapie u chirurgicky neresekovatelných adenomů bez útlaku chiasmatu, zejména jde-li (vzhledem k operaci) o rizikového pacienta [8].

### 3.7.1 Léčiva používaná v terapii akromegalie

K dispozici jsou tři skupiny léčiv:

1. dopaminergní agonista (DA) – kabergolin
2. SSA – 1. generace – lanreotid a oktreetid v depotní formě  
– 2. generace – pasireotid v depotní formě
3. blokátor receptorů pro STH - pegvisomant

První dvě skupiny působí agonisticky na receptory přímo na buňkách adenomu. Třetí skupina (pegvisomant) blokuje účinek STH na úrovni jeho receptoru v periferních tkáních. Často se podává kombinovaná léčba preparáty z různých skupin [8,29].

### 3.7.1.1 Kabergolin

Kabergolin je derivátem námelových alkaloidů druhé generace a účinkuje jako agonista D2DR, k němuž vykazuje nejvyšší afinitu. Farmakologická aktivita kabergolinu se přičítá D2DR inhibiční signalizaci prostřednictvím G proteinu a jeho vlivu na sekreci a proliferaci nádorových buněk.

Efektivita kabergolinu je nejvyšší (až 29 %) u mírně aktivní akromegalie. U neselektovaných pacientů s akromegalií lze efektivitu potlačení nadprodukce STH očekávat pod 10 %. Výhodou je většinou dobrá tolerance kabergolinu a výrazně nižší cena oproti zbývajícím skupinám léčiv. Vedlejší účinky nejsou časté a mohou se projevit například nauzeou, zácpou, depresemi, ortostatickou hypotenzí nebo gamblerstvím [14,30].

### 3.7.1.2 Analoga somatostatinu (SSA)

Somatostatinová analoga jsou látky, které po vazbě na somatostatinový receptor vykazují obdobné farmakodynamické účinky jako somatostatin. Jejich podání vede k poklesu sekreční aktivity tumoru, k redukci hladin STH a IGF-1 a k redukci objemu tumoru. Redukce STH a IGF-1 na normální úroveň a redukce objemu tumoru jsou dvě nejčastěji hodnocené veličiny v případě posuzování léčebné odpovědi [14,31-33].

#### **První generace**

První generaci tvoří lanreotid a oktreotid, které představují dnes nejrozšířenější medikamentózní léčbu akromegalie a podávají se v depotní formě (Somatuline Autogel – Ipsen, Sandostatin LAR – Novartis). Obvyklý interval mezi injekcemi je 28 dní, ale intervaly mohou být i delší podle délky přetrvávání efektu. Dávka je volena podle laboratorní a klinické odpovědi na podávanou léčbu. Tyto preparáty působí především na somatostatinový receptor typu 2 (SSTR2), který je v adenomech nejrozšířenější, a mají nízkou afinitu k ostatním SSTR. Jejich efektivita k úplnému potlačení aktivity akromegalie je při hodnocení podle nejpřísnějších kritérií u neselektovaných neléčených pacientů kolem 25 %. Ke zmenšení adenomu o >20 % dochází u cca 75 % pacientů s největším efektem při primoterapii. Podávají se v monoterapii i v kombinaci. Účinnost stoupá s délkou podávání. Efekt lanreotidu a oktreotidu na aktivitu akromegalie je

srovnatelný, ale někteří pacienti preferují z hlediska tolerance léčby jen jeden z preparátů [8,14,34].

K vedlejším účinkům patří především působení na exokrinní funkci pankreatu, která se projeví abdominálním diskomfortem a průjmami, a dále tvorba žlučových kamenů. Někdy může suprese sekrece inzulinu zhoršit kompenzaci diabetes mellitus, ale obvykle je to vyváženo poklesem sekrece STH a ke zhoršení DM nedochází [8].

**Oktreotid** byl syntetizován jako první na začátku osmdesátých let. Jedná se o peptid tvořený osmi aminokyselinami a od somatostatinu-14 se odlišuje 3 aminokyselinami, které jsou u somatostatinu zodpovědné za jeho degradabilitu. Ve srovnání se somatostatinem má oktreotid významně delší biologický poločas (1,5 – 2 h), nejspíše na základě rezistence k endosomálním proteázám a proteolytické aktivitě séra, která se podílí na inaktivaci normálního somatostatinu. Oktreotid existuje ve formě okamžitě se uvolňujícího oktreotid acetátu s výše uvedeným poločasem. V současné době se však využívá především LAR forma, určená k intramuskulární aplikaci. LAR forma představuje oktreotid acetát vázaný na polymerové mikrosféry poly(D,L-laktid-co-glykolidu), které jsou v těle postupně degradovány, což vede k řízenému uvolňování přípravku [14,35,43]. Oktreotid má nejvyšší afinitu k SSTR2, o něco nižší afinitu k SSTR5, ještě nižší afinitu k SSTR3 a nejnižší afinitu k SSTR1 a SSTR4 [14,32,34].

**Lanreotid** byl druhý somatostatinový analog zavedený na konci osmdesátých let do klinické praxe. Obdobně jako v případě oktreotidu se jedná o oktapeptid se substitucí některých aminokyselin za účelem prodloužení biologické aktivity. Lanreotid acetát má poločas 2 h, klinicky je však standardně dostupný v déle účinkujících formách (SR) podávaných každých 10-14 dnů a Autogel s depotním prodlouženým uvolňováním podávaný každých 21-28 dnů [14,36,37]. Lanreotid má nejvyšší afinitu k SSTR2, o něco nižší afinitu k SSTR3, ještě nižší afinitu k SSTR5 a nejnižší afinitu k SSTR1 a SSTR4 [14,32,34].

### **Druhá generace**

Druhou generaci SSA představuje **pasireotid** podávaný dnes též v depotní formě (Signifor LAR – Novartis). Pasireotid je třetí klinicky zavedený somatostatinový analog. Jedná se o cyklický hexapeptid s biologickým poločasem přibližně 12 h. Má výrazně vyšší afinitu k somatostatinovým receptorům typu 5, 1 a 3 a mírně nižší k typu 2 ve srovnání

s první generací. Proto může být účinnější u některých pacientů rezistentních k SSA 1. generace. Jeho hlavní nevýhodou je výrazně negativní působení na glukózový metabolismus s rozvojem hyperglykemie až DM u 50 % pacientů. Dále je to též vysoká cena [14,34,38,39].

### 3.7.1.3 Pegvisomant

Pegvisomant (Somavert, Pfizer) je blokátor receptorů pro STH. Jedná se o modifikovanou molekulu STH, kde je posílena vazba na receptor a současně je molekula změněna tak, aby nedocházelo k funkční dimerizaci receptoru, která je nutná k účinku STH. Tím je zajištěna blokáda účinku endogenního STH v periferních tkáních. Aplikuje se subkutánně denně v monoterapii nebo v kombinační léčbě se SSA několikrát v týdnu. Kromě příznivého účinku na klinické symptomy a na laboratorní parametry aktivity onemocnění bývá někdy výrazný účinek na metabolismus glukózy s významným zlepšením kompenzace DM (s nutností redukovat antidiabetickou léčbu). K vedlejším účinkům patří reakce v místě vpichu, lokální lipohypertrofie a tranzitorní elevace transamináz. Při velmi intenzivní léčbě pegvisomantem lze vyvolat až klinický obraz deficitu STH. Léčba pegvisomantem je omezena na specializovaná centra a představuje nejnákladnější léčbu [8,40].

### 3.7.2 Klinické účinky léčby

Při potlačení aktivity akromegalie s normalizací IGF-1 dochází k částečné regresi klinických projevů – zmenšení aker v oblasti měkkých tkání (změny na skeletu jsou nevratné), zmírnění nebo vymizení nadměrného pocení, zmírnění až úplný ústup syndromu karpálního tunelu, může dojít ke zlepšení metabolické kompenzace DM, zlepšení kardiální kompenzace a podobně. Studie prokázaly, že potlačení aktivity akromegalie vede k významnému zlepšení kvality života a úpravě očekávané délky dožití na úroveň zdravé populace [8].

### 3.7.3 Rezistence somatotropních adenomů hypofýzy na léčbu SSA

V klinické praxi není pozitivní odpověď tumoru na léčbu somatostatinovými analogy pravidlem. Jako rezistence na léčbu SSA je obvykle považováno nedosažení biochemické remise, redukce tumoru o méně než 20 %, nebo růst tumoru během léčby.

Možnost identifikovat pacienty, pro které léčba somatostatinovými analogy nepředstavuje terapeutický benefit je důležité, jelikož tito pacienti mohou primárně více profitovat z jiných léčebných modalit. U těchto pacientů nemusí docházet k léčebnému prodlení po dobu aplikace neúčinné léčby. Bylo by možné redukovat finanční náklady na neúčinnou léčbu a zároveň předejít vedlejším účinkům této léčby. Lze předpokládat, že by identifikace těchto pacientů na histologické úrovni měla ve srovnání s identifikací na klinické úrovni větší význam, neboť zatímco výsledky histologického vyšetření jsou obvykle dostupné v řádu dní, u klinických hodnot (pokles IGF1 a redukce objemu po třech měsících léčby) je hodnocení časově náročnější a implikuje významně větší prodlevu. Z výše uvedených důvodů byly mechanismy resistance somatotropních adenomů na léčbu SSA extenzivně studovány, ale nejsou dodnes zcela objasněny. Studovány jsou tři možné příčiny: inaktivační mutace genů kódujících SSTR, porucha mechanismů signalizačních kaskád a variabilní exprese SSTR v tumorech [14,37,41,42].

### 3.7.4 Obecné faktory ovlivňující odpověď na léčbu SSA

Působení somatostatinových analog v cílových buňkách je podmíněno vazbou na SSTR. Hlavní roli v rámci signalizace somatostatinových analog tedy hraje exprimovaný subtyp receptoru, kvantita exprese receptoru, membránová lokalizace receptoru a jeho intracelulární kinetika a tvorba heterodimerů s jinými subtypy SSTR. Výše uvedené parametry exprese SSTR byly ve vztahu k predikci odpovědi somatotropních adenomů na léčbu SSA zkoumány v několika studiích. Vzhledem k údajům o minimální expresi SSTR4 a výrazně nízké afinitě k užívaným SSA nebude subtyp SSTR4 dále diskutován [14,32,43].

Odpověď na SSA se výrazně liší mezi jednotlivými pacienty a neexistuje univerzální ukazatel předpovídající pozitivní odpověď na léčbu; za nejvýznamnější ukazatel odpovědi se v současné době považuje exprese SSTR2, jehož absence má vysokou negativní prediktivní hodnotu, avšak přítomnost SSTR2 odpověď na léčbu SSA nezaručuje. Z tohoto důvodu je nutné hledat další možné faktory a mechanismy určující léčebnou rezistenci. Význam dalších podtypů SSTR je v současnosti sporný a výsledky jednotlivých studií k tomuto tématu se neshodují, lze však předpokládat, že s častějším využitím novějších SSA s vyšší afinitou k SSTR5, 3 a 1 bude klinický význam těchto receptorů narůstat [14].



### 3.7.4.1 Účinky aktivovaných SSTR

Signální dráhy zprostředkované aktivací SSTR receptorů mají účinky antisekreční (SSTR1-5), antiproliferační (SSTR1, 2, 4 a 5), antiangiogenní (SSTR1-3) a proapoptotické (SSTR2, 3). Účinky SSTR receptorů na buněčné funkce jsou komplexní, zahrnují interakce mezi různými, navzájem nezávislými signálními kaskádami [14,37,44].

### 3.7.4.2 Jednotlivé podtypy SSTR v somatotropních adenomech

#### hypofýzy a jejich vliv na léčebnou odpověď na SSA

Exprese jednotlivých podtypů SSTR v buňkách somatotropních adenomů hypofýzy byla opakovaně studována jak imunohistochemicky, tak i metodami molekulární genetiky (RT-qPCR), a to jak před léčbou SSA, tak i po léčbě [14].

Několika studii [43,45-48] bylo zjištěno, že exprese **SSTR1** je u většiny somatotropních adenomů hypofýzy nízká a intenzita exprese se neliší mezi tumory, které byly či nebyly před operací vystaveny léčbě SSA. SSTR1 byl detekován převážně v cytoplasmě. Některé studie došly k závěru, že u pacientů s pozitivní odpovědí na léčbu byla exprese SSTR1 významně vyšší [14,46].

**SSTR2** je považován za receptor zodpovědný za antisekreční a antiproliferační účinky somatostatinu a somatostatinových analog v somatotropních adenomech hypofýzy. Imunohistochemická pozitivita je převážně membránového charakteru. SSTR2 je po SSTR5 nejvíce exprimovaným receptorem v somatotropních adenomech hypofýzy. Exprese mezi pacienty s předchozí léčbou SSA a bez léčby je srovnatelná. U DGST je exprese výrazně vyšší než u SGST. Nízká nebo žádná exprese SSTR2 je spojována s horší odpovědí na léčbu SSA, ovšem i vyšší exprese SSTR2 dobrou odpověď na léčbu SSA nezaručuje [14,43-49].

**SSTR3** má nižší expresi ve srovnání se SSTR2. U DGST a SGST je exprimován stejnou měrou. Mezi pacienty s předchozí léčbou SSA a bez léčby je exprese srovnatelná. Je spíše membránová, méně často též cytoplazmatická. Vztah mezi expresí SSTR3 a odpovědí na léčbu SSA není prozatím jasný a bude zapotřebí dalšího zkoumání [14,46-48,50].

**SSTR5** je podobně jako SSTR2 exprimován ve většině somatotropních adenomů hypofýzy. Má ve srovnání s ostatními somatostatinovými receptory nejvyšší expresi. V SGST má znatelně vyšší expresi než u DGST. Byla u něj pozorována membránová i cytoplazmatická exprese. Korelace mezi expresí SSTR5 a redukcí objemu tumoru nebo biochemickou odpovědí na léčbu SSA nebyla v dosavadních studiích pozorována a bude zřejmě rovněž zapotřebí dalšího zkoumání [14,43-50].

### 3.7.4.3 E-cadherin, jeho exprese v somatotropních adenomech

#### hypofýzy a ovlivnění odpovědi na léčbu SSA

E-cadherin je transmembránový adhezivní glykoprotein exprimovaný v epiteliálních tkáních. Hraje roli v mnoha biologických procesech, jako je buněčná signalizace, embryogeneze, uspořádání tkání, onkogeneze epiteliálních tumorů aj. Exprese E-cadherinu byla detekována v buňkách normální hypofýzy. Několika studiemi bylo zjištěno, že se nízká exprese E-cadherinu nachází u SGST a má souvislost s větší velikostí a invazivitou tumoru. Exprese E-cadherinu se liší v závislosti na histologickém subtypu. Téměř ve všech studiích vykazovaly analyzované SGST ztrátu nebo výrazně nižší expresi E-cadherinu v porovnání s DGST. Nádory s nízkou expresí E-cadherinu byly ve studiích větší a vykazovaly vyšší invazivitu ve srovnání s tumory s vysokou expresí. Některé studie daly do souvislosti nízkou expresi E-cadherinu a rezistenci na léčbu SSA [14,51-56].

### 3.7.5 Odpověď na léčbu DA u somatotropních adenomů hypofýzy

U léčených pacientů se sledovala hladina IGF-1. K normalizaci této hladiny při monoterapii DA došlo u 30-55 % pacientů. Velká část pacientů (téměř 90 %) však při terapii DA pocítovala subjektivní zlepšení klinických příznaků. Kombinace léčby DA a SSA měla pozitivní synergický efekt [14,57-60].

#### 3.7.5.1 Rezistence somatotropních adenomů hypofýzy na léčbu DA

Podobně jako u SSTR i u DA existuje několik mechanismů, které se na rezistenci podílí. Jedná se o inaktivační mutace genu pro D2DR, změny v signalizačních kaskádách a snížená exprese D2DR v tumorech. Farmakologická účinnost dopaminu a DA je zprostředkována inhibiční kaskádou přes D2DR a G protein a jeho ovlivnění sekrece a proliferace buněk adenomu [14,61].

## 4. Experimentální část

### 4.1 Registr RESET a data získaná z registru

Údaje všech pacientů zařazených do studie byly zpracovány a vyhodnoceny v registru RESET (registr selárních tumorů, <http://reset.registry.cz/>) spravovaného Institutem biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně. Registr byl veden jako multicentrická platforma pro evidenci pacientů se selárními tumory, na níž se podílela klinická centra napříč Českou a Slovenskou republikou. Do registru byli zařazeni pacienti diagnostikovaní a léčeni s akromegalií v rozmezí let 2000–2015 na území České a Slovenské republiky. Studie byla schválena Českou endokrinologickou společností a též etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde byla provedena experimentální část studie. Údaje v registru byly vedeny ve formě data narození, pohlaví a nacionalit. Zadávající klinická pracoviště poskytla do registru vstupní klinické a laboratorní parametry pacientů ve standardizované formě. Dále pracoviště poskytla do registru záznamy o průběhu vlastní terapie (operace, radioterapie, farmakoterapie SSA a DA) včetně údajů o délce trvání terapie a jejích výsledcích v podobě průběžných laboratorních parametrů. Většina klinických dat pro účely této práce byla získána z údajů v registru.

Pro účely této práce byly z registru použity následující klinické a laboratorní údaje: pohlaví a věk pacienta v době diagnózy, vstupní a výstupní sérová hladina STH, vstupní a výstupní sérová hladina IGF1 ve formě násobku normy hladiny IGF1 pro daný věk pacienta a objem tumoru v době diagnózy a na konci sledovaného časového intervalu. Dále pak druh použité léčby a délka jejího trvání. Z celé skupiny byl vybrán podsoubor pacientů definovaných jako nemocní léčení operativně a současně farmakoterapeuticky somatostatinovými analogy, bez radioterapeutické intervence. Odpověď na léčbu byla hodnocena jako procentuální redukce násobku normy hladiny IGF1 v době mezi započatí léčby SSA a posledním dostupným vyšetřením během farmakoterapie [14,62].

### 4.2 Použité vzorky hypofyzárních adenomů

Vlastní patologická studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK). Za účelem patologické analýzy na Fingerlandově ústavu

patologie (FÚP) FNHK byly zapůjčeny parafinové bloky se vzorky somatotropních adenomů hypofýzy od pacientů s akromegalií zařazených do registru RESET. Bloky byly získány jednak z archivu FÚP, dále z oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice v Praze, z Ústavu patologie Fakultní nemocnice v Brně, z Šiklova ústavu patologie Fakultní nemocnice v Plzni, z Ústavu patologie Univerzitní nemocnice L. Pasteura v Košicích a z oddělení patologie v Nemocnici Nové Zámky. Nativní materiál tumorů byl na výše uvedených pracovištích fixován ve formaldehydu a následně zpracován standardní histologickou parafinovou technikou do podoby parafinových bločků. Materiál byl pro účely práce vyšetřen zaslepeně k původní histologické diagnóze [14,62].

### 4.3 Metodika morfologického vyšetření

Parafinové bločky byly nakrájeny na řezy o síle 3  $\mu\text{m}$ , jež byly standardní automatizovanou procedurou obarveny hematoxylinem a eozinem. Takto připravené řezy byly prohlédnuty za použití mikroskopu Nikon Eclipse E200. V řezech byla nejprve identifikována přítomnost tumoru. V několika případech byl dodatečný tkáňový řez totožné síly (3  $\mu\text{m}$ ) impregnován stříbrem (metodou dle Gömöriho) za účelem znázornění retikulinových vláken pro lepší identifikaci vlastního tumoru [14,62].

### 4.4 Imunohistochemické vyšetření tumorů

V nádorech byla zhodnocena přítomnost exprese vybraných proteinů prostřednictvím standardizované imunohistochemické reakce. Nejprve byly z bločku zhotoveny řezy o síle 3  $\mu\text{m}$ . Řezy byly odparafinovány, bylo provedeno demaskování epitopů, následně byly řezy inkubovány s primární protilátkou a poté byl použit detekční systém se sekundární protilátkou. Jako chromogen byl v reakci použit 3,3'-diaminobenzidin (DAB) a řezy byly následně dobarveny hematoxylinem. Výše popsaný proces byl proveden v automatizovaném systému Ventana Benchmark Ultra stainer od firmy Roche (Tucson, AR, USA) anebo v automatizovaném systému Autostainer 48 od firmy Agilent/Dako (Santa Clara, CA, USA). U systému Autostainer 48 byl pro demaskování epitopů použit přístroj PT-Link od téhož výrobce. U systému Ventana Benchmark Ultra stainer byl pro demaskování epitopů použit roztok Cell Conditioning 1 (CC1) od firmy Roche. Oba systémy využívaly principu demaskování epitopů pomocí vysoké teploty (HIER) v předdefinovaném pH. Jako detekční systém byly

použity produkty Ventana ultraView a Ventana OptiView od firmy Roche a EnVision Flex od firmy DAKO. Doba a způsob demaskování epitopů, výrobce a klon primární protilátky, použitá koncentrace protilátky, délka inkubace protilátky a použitý detekční systém pro danou protilátku jsou uvedeny v tabulce 2.

Imunohistochemické vyšetření SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu bylo provedeno ve všech dostupných vzorcích.

Jako pozitivní kontrola imunohistochemické reakce sloužila u E-cadherinu tkáň apendixu, u D2DR tkáň normální hypofýzy a u SSTR1, SSTR2, SSTR3 a SSTR5 tkáň pankreatu s Langerhansovými ostrůvky [14,62].

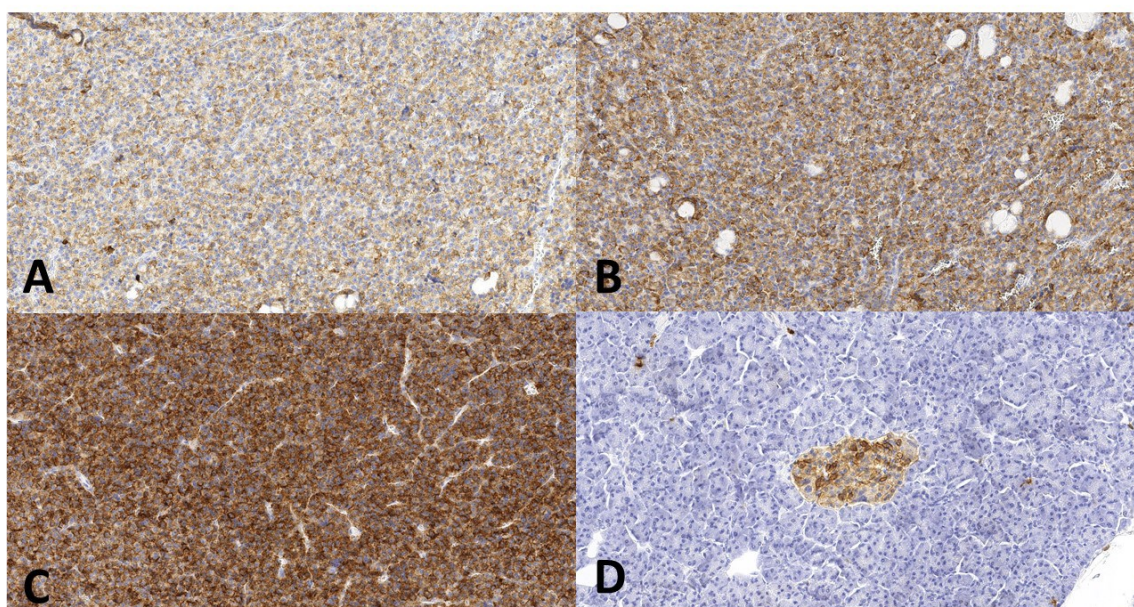
**Tabulka 2.** Použité protilátky a stručná charakteristika imunohistochemických reakcí. Převzato a upraveno dle [14].

Protilátka	Klon	Ředění	Výrobce	Demaskování epitopů	Doba inkubace	Detekční systém
SSTR1	UMB7	1:100	Abcam, Cambridge, USA	Tris-EDTA pH9, 97°C, 20 min.	30 minut	DAKO EnVision FLEX
SSTR2	UMB1	1:1500	Abcam, Cambridge, USA	Ventana CC1, 36 minut	32 minut	Ventana ultraView
SSTR3	UMB5	1:750	Abcam, Cambridge, USA	Ventana CC1, 20 minut	36 minut	Ventana ultraView
SSTR5	UMB4	1:750	Abcam, Cambridge, USA	Ventana CC1, 32 minut	32 minut	Ventana OptiView
D2DR	Polykl.	1:200	Origene, Rockville, USA	Ventana CC1, 16 minut	32 minut	Ventana OptiView
E-cadherin	NCH-38	1:50	Dako, Glostrup, Denmark	Ventana CC1, 52 minut	32 minut	Ventana ultraView

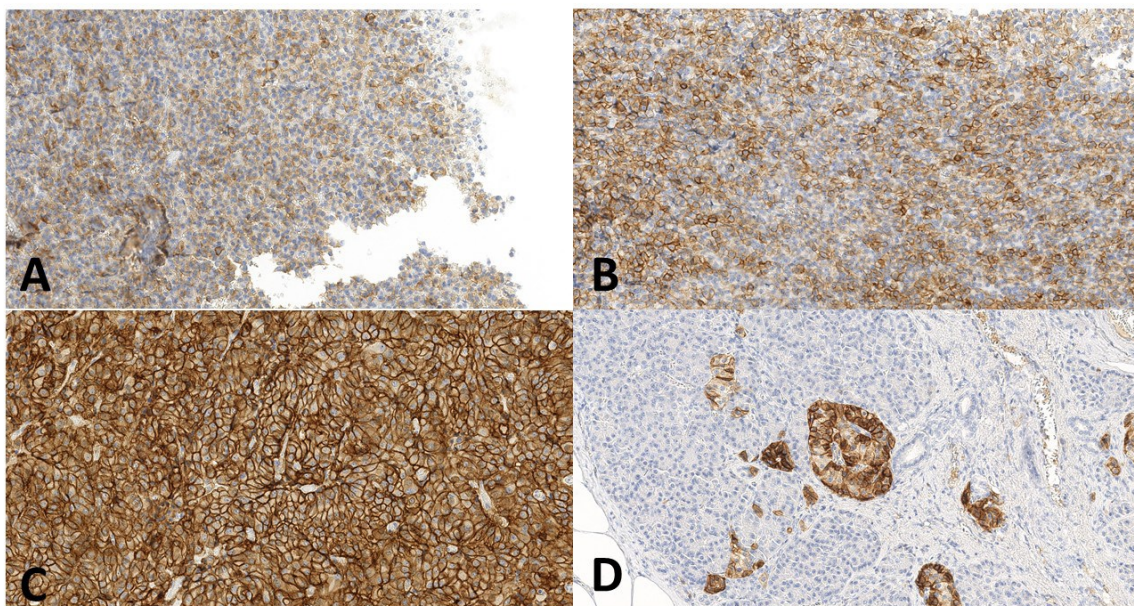
## 4.5 Hodnocení exprese jednotlivých SSTR, D2DR a E-cadherinu

Expres SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu byla hodnocena formou H-skóre. H-skóre je představováno celočíselnou hodnotou v intervalu 0-300, jež reflektuje procentuální podíl imunoreaktivních buněk a intenzitu imunohistochemické reakce. Při hodnocení H-skóre bylo zaznamenáno nejprve procento slabě pozitivních buněk, procento středně silně pozitivních buněk a procento silně pozitivních buněk. Slabé pozitivitě byl přiřazen koeficient 1, střední pozitivitě 2 a silné pozitivitě 3. Reprezentativní příklady positivity pro jednotlivé SSTR, D2DR a E-cadherinu jsou znázorněny na obrázcích 5, 6, 7, 8, 9 a 10. H-skóre bylo vypočteno součtem násobků koeficientů intenzity a jejich procentuálního zastoupení ve tkáni tumoru: např. v případě tumoru s 30 % buněk se slabou pozitivitou, 10 % buněk se středně silnou pozitivitou a

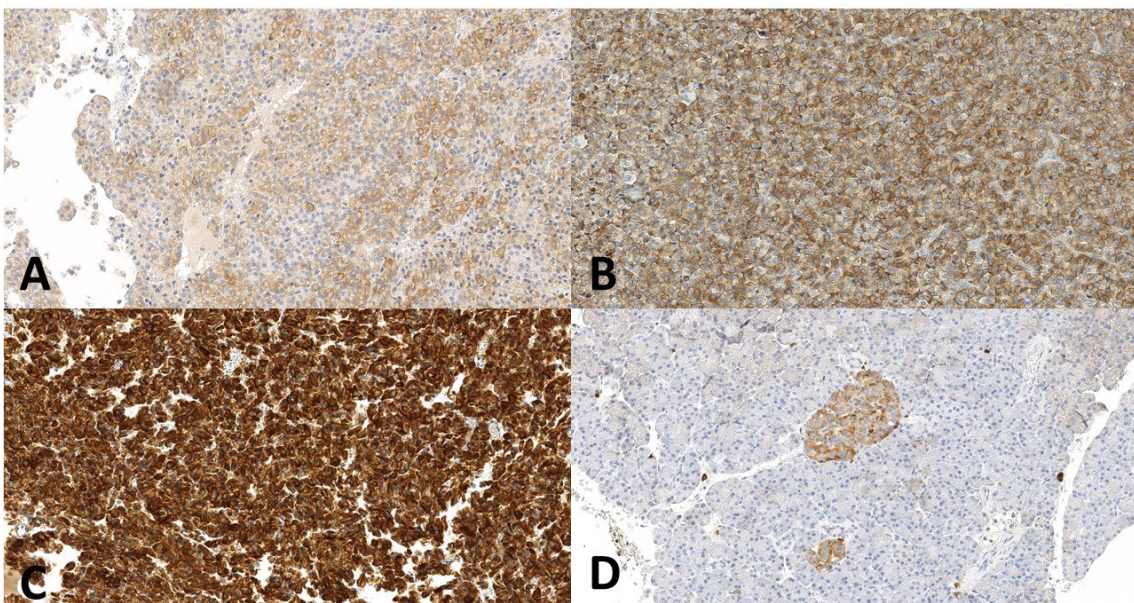
20 % silně pozitivních buněk bylo výsledné H-skóre 110 (30 x 1 + 10 x 2 + 20 x 3). Současně bylo zaznamenáno celkové procento pozitivních buněk (ve výše uvedeném příkladu by se jednalo o 60 %). Ke zvýšení přesnosti měření byla tímto postupem hodnocena exprese výše uvedených proteinů celkem 3 nezávislymi pozorovateli (Dr. Krbalová, Dr. Soukup a Dr. Manethová) po předchozím konsensuálním setkání u vícehlavého mikroskopu, kde byla pro každou jednotlivou protilátku diskutována intenzita positivity a způsob hodnocení procentuálního zastoupení buněčných populací. V některých komplexních případech vyznačil zkušený atestovaný patolog Dr. Soukup na skle pro potřeby hodnocení oblast se strukturami tumoru. Každý z pozorovatelů hodnotil vzorky zaslepeně k hodnocení zbývajících dvou osob. Výsledná hodnota H-skóre i procentuálního zastoupení pozitivních buněk byla spočítána jako průměr těchto tří měření [14,62].



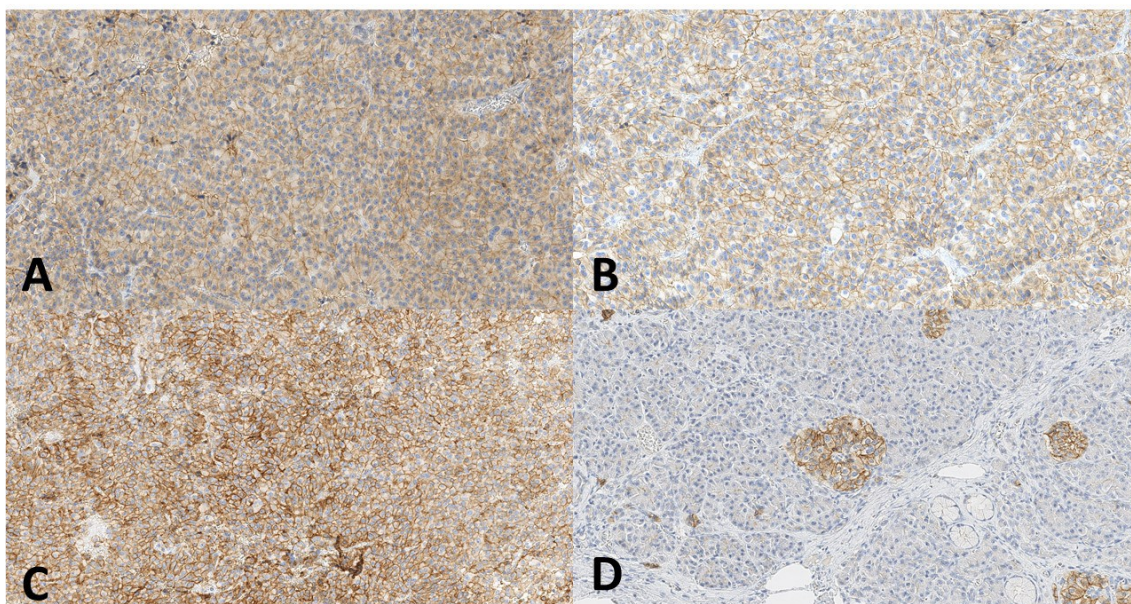
**Obrázek 5.** Intenzity exprese SSTR1 (200× zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). Převzato a upraveno dle [14].



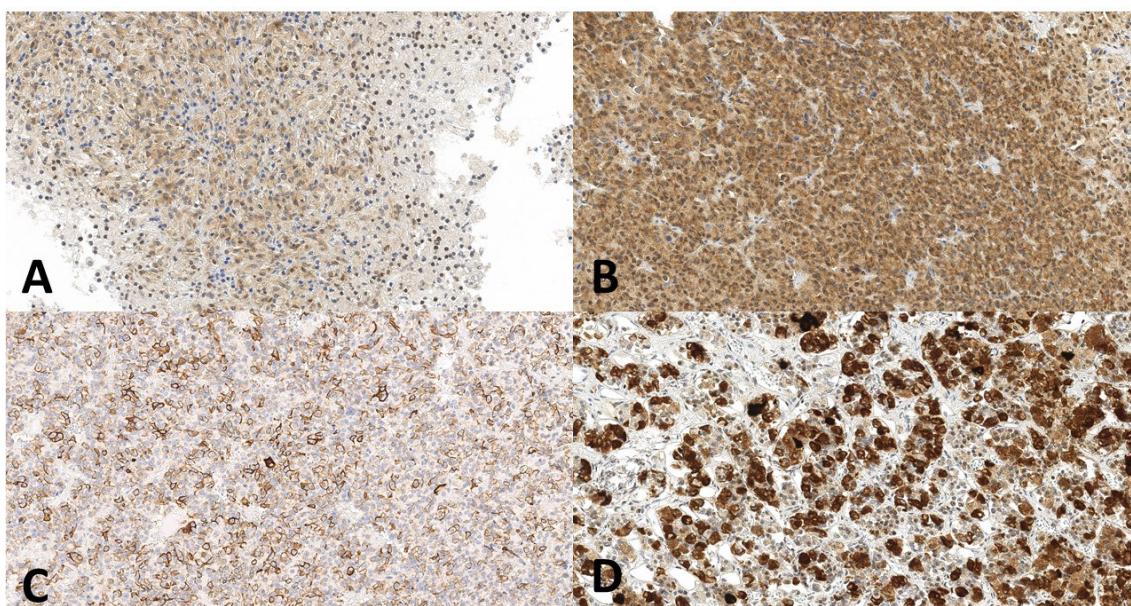
**Obrázek 6.** Intenzity exprese SSTR2 (200× zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). Převzato a upraveno dle [14].



**Obrázek 7.** Intenzity exprese SSTR3 (200× zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). Převzato a upraveno dle [14].

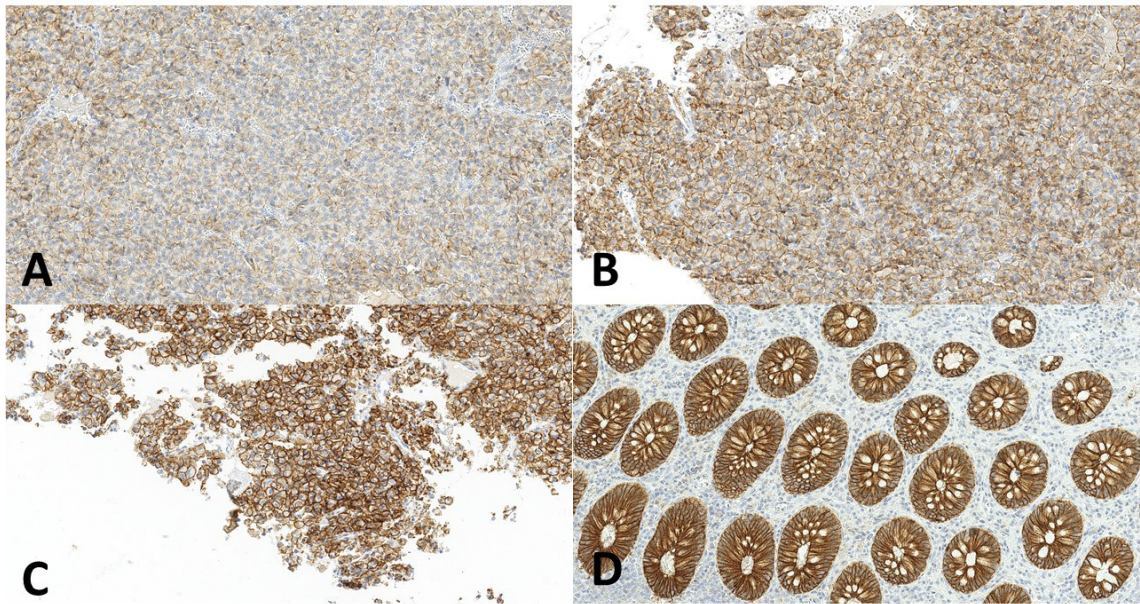


**Obrázek 8.** Intenzity exprese SSTR5 (200× zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). Převzato a upraveno dle [14].



**Obrázek 9.** Intenzity exprese D2DR (200× zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). Převzato a upraveno dle [14].





**Obrázek 10.** Intenzity exprese E-cadherinu (200× zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (apendix). Převzato a upraveno dle [14].

## 4.6 Statistické zpracování dat

Údaje byly zpracovány pomocí programů Microsoft Excel a Access. Samotná statistická analýza byla provedena v programu SigmaPlot 14.0 od firmy Systat Software. Údaje ve výsledkové části jsou uvedeny jako průměr hodnot  $\pm$  směrodatná odchylka ( $\mu \pm SD$ ), k testování hypotéz byl použit parametrický Studentův t-test (Stt) a analýza rozptylu (ANOVA). Hladina významnosti všech použitých testů byla považována za statisticky signifikantní pokud  $p < 0,05$ . Číselné hodnoty výsledků byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa [14,62].

## 5. Výsledky

### 5.1 Obecné poznámky

Do této práce bylo zahrnuto celkem 114 tumorů od 110 pacientů (4 pacienti byli operováni dvakrát). K vlastní analýze byly použity tkáně tumorů z první operace. Celkem 9 pacientů absolvovalo před první operací léčbu SSA první generace (oktreotid nebo lanreotid) a 4 pacienti léčbu kabergolinem. Z těchto čtyřech pacientů navíc podstoupili tři léčbu SSA, nízký počet těchto případů však neumožňoval smysluplnou statistickou analýzu.

Každý vzorek byl zhodnocen nezávisle třemi pozorovateli (Dr. Krbalová, Dr. Soukup a Dr. Manethová). Byl stanoven procentuální podíl imunoreaktivních buněk a intenzita imunohistochemické reakce. Z těchto údajů byla vypočtena hodnota **H-skóre**, která vyjadřuje celkovou míru exprese studovaného proteinu (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) ve vzorku nádoru. Tato hodnota je klíčovým údajem, ze kterého vychází většina statistických hodnocení analyzovaného souboru pacientů.

### 5.2 Neoadjuvantní léčba SSA první generace a její vliv na hodnoty H-skóre studovaných proteinů

Podskupina s neoadjuvantní léčbou SSA první generace (oktreotid, lanreotid) zahrnovala celkem 9 pacientů (podskupina bez předchozí léčby 101 pacientů). Medián trvání léčby před operací byl 10 měsíců, průměr 15 měsíců. Průměrná doba mezi ukončením léčby SSA a operací byla 7 měsíců, medián tohoto intervalu 1 měsíc. Z těchto 9 tumorů patřilo 5 do skupiny SGST, 2 do skupiny DGST a 2 do skupiny SLT. Rozdíly mezi skupinou pacientů s neoadjuvantní léčbou a bez ní jsou popsány v tabulce 3.

**Tabulka 3.** Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů ve skupině předléčených a nepředléčených pacientů.

		Předléčení ( $\mu \pm SD$ )	Nepředléčení ( $\mu \pm SD$ )	p hodnota (Stt)
H-skóre	SSTR1	1,54 $\pm$ 9,23	0,95 $\pm$ 31,52	0,78
	SSTR2	133,54 $\pm$ 79,22	177,13 $\pm$ 90,88	0,12
	SSTR3	52,77 $\pm$ 59,37	70,32 $\pm$ 71,60	0,71
	SSTR5	98,21 $\pm$ 60,73	69,15 $\pm$ 69,22	0,60
	D2DR	18,73 $\pm$ 29,13	25,20 $\pm$ 40,44	0,28
	E-cadherin	99,07 $\pm$ 82,55	132,45 $\pm$ 101,22	0,19

Ze získaných hodnot H-skóre jednotlivých proteinů vyplývá, že léčba předcházející operaci nijak neovlivňuje míru exprese studovaných proteinů.

### 5.3 Vliv pohlaví na hodnoty H-skóre studovaných proteinů a na průměrný věk pacientů v době stanovení diagnózy

V tabulce 4 jsou shrnuty rozdíly průměrného věku mužů a žen v době stanovení diagnózy a dále rozdíly v hodnotách H-skóre studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) v závislosti na pohlaví.

**Tabulka 4.** Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů a věku mezi skupinou mužů a žen.

		Muži ( $\mu \pm SD$ )	Ženy ( $\mu \pm SD$ )	p hodnota (Stt)
	Věk (roky)	43,46 $\pm$ 9,56	49,96 $\pm$ 14,05	<b>0,02</b>
H-skóre	SSTR1	0,87 $\pm$ 27,55	0,73 $\pm$ 7,34	0,47
	SSTR2	201,06 $\pm$ 69,23	168,72 $\pm$ 88,33	<b>0,04</b>
	SSTR3	70,13 $\pm$ 59,06	48,73 $\pm$ 66,78	0,94
	SSTR5	58,13 $\pm$ 69,84	79,73 $\pm$ 58,77	0,18
	D2DR	19,23 $\pm$ 42,40	28,70 $\pm$ 36,38	0,86
	E-cadherin	137,44 $\pm$ 89,53	98,43 $\pm$ 100,02	0,17

Statisticky významným se v této analýze zdá být věkový průměr, který je v době stanovení diagnózy u mužů nižší než u žen. A dále hodnota H-skóre u SSTR2, která je naopak vyšší u mužů než u žen.

### 5.4 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi podskupinou SGST a non-SGST

Celý soubor 110 vzorků adenomů hypofýzy byl pro následující statistické analýzy zhodnocen zkušeným atestovaným patologem MUDr. Jiřím Soukupem, Ph.D. a rozčleněn podle histologického vzhledu na podskupiny. Celkem 45 nádorů bylo klasifikováno jako SGST (41 %), 29 jako DGST (26 %), 26 jako SLT (24 %) a 10 jako PHA (9 %). Pojem non-SGST zahrnuje všechny podskupiny (DGST, SLT a PHA) kromě SGST.

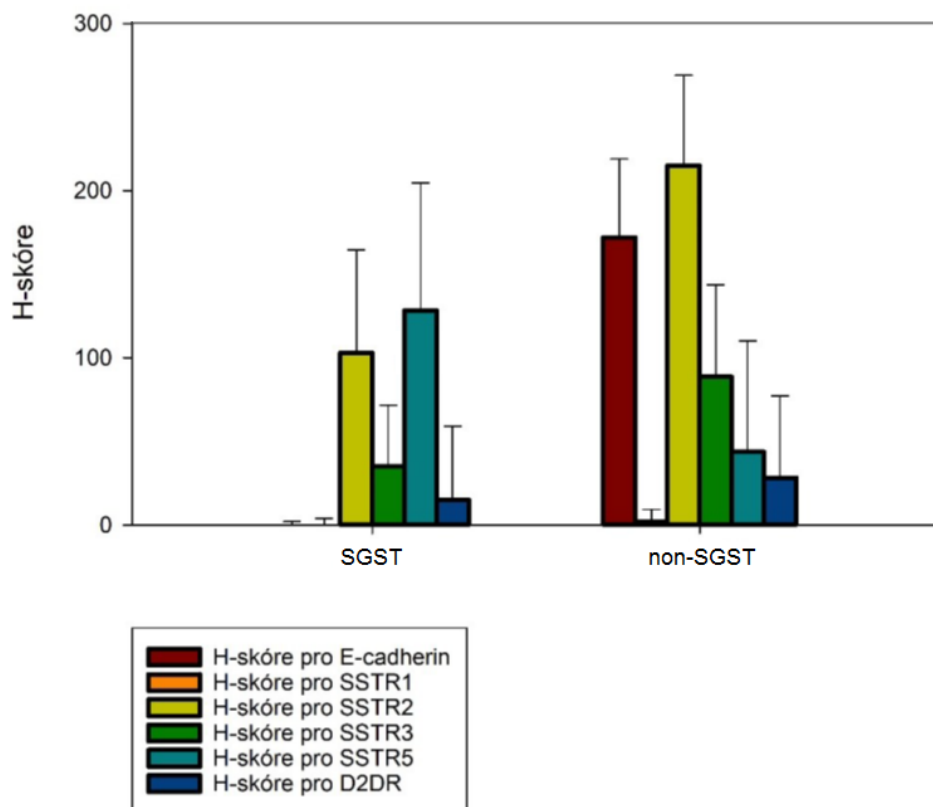
Podskupiny SGST a non-SGST jsme porovnávali opět v hodnotách H-skóre studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) a výsledek tohoto zkoumání je shrnut do tabulky 5 a přehledně znázorněn na obrázku 11.

<b>Tabulka 5.</b> Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi podskupinou SGST a non-SGST.		SGST ( $\mu \pm SD$ )	non-SGST ( $\mu \pm SD$ )	p hodnota (Stt)
H-skóre	SSTR1	0,27 $\pm$ 8,05	1,98 $\pm$ 30,65	0,32
	SSTR2	102,00 $\pm$ 80,39	212,12 $\pm$ 66,23	<b>0,01</b>
	SSTR3	26,32 $\pm$ 29,97	92,24 $\pm$ 77,12	<b>0,02</b>
	SSTR5	129,15 $\pm$ 69,58	38,85 $\pm$ 61,88	<b>0,02</b>
	D2DR	14,96 $\pm$ 29,08	30,02 $\pm$ 39,65	0,15
	E-cadherin	0,04 $\pm$ 40,02	169,58 $\pm$ 66,02	<b>0,01</b>

Jak je z tabulky patrné, podskupiny hypofyzárních adenomů SGST a non-SGST se od sebe navzájem statisticky významně liší hned v několika parametrech. Podskupina non-SGST má oproti podskupině SGST vyšší H-skóre u proteinů SSTR2, SSTR3 a E-cadherinu, a naopak nižší H-skóre u proteinu SSTR5.

Dále můžeme z tabulky vyčíst, že v podskupině non-SGST je nejvíce exprimován protein SSTR2, o něco méně pak E-cadherin, následně SSTR3 a nejméně SSTR5. V podskupině SGST je naopak nejvíce exprimován protein SSTR5 následován SSTR2, SSTR3, a nakonec E-cadherin, který je exprimován nejméně.

### Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi podskupinou SGST a non-SGST



**Obrázek 11.** Rozdíly hodnot H-skóre u studovaných proteinů mezi podskupinami adenomů hypofýzy SGST a non-SGST.

### 5.5 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů v rámci podskupiny non-SGST

V následující analýze jsme porovnávali hodnoty H-skóre studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) v rámci podskupiny non-SGST adenomů hypofýzy. Konkrétně tedy u DGST, SLT a PHA. Výsledky tohoto zkoumání jsou přehledně shrnuty v tabulce 6.

<b>Tabulka 6.</b>		DGST ( $\mu \pm SD$ )	SLT ( $\mu \pm SD$ )	PHA ( $\mu \pm SD$ )	p hodnota (ANOVA)
Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů v rámci podskupiny non-SGST.					
H-skóre	SSTR1	1,94 ± 38,76	4,23 ± 16,63	0,87 ± 5,48	0,91
	SSTR2	229,58 ± 58,25	211,15 ± 60,05	191,75 ± 88,59	0,12
	SSTR3	108,23 ± 74,01	78,09 ± 48,05	95,42 ± 69,35	0,28
	SSTR5	79,56 ± 59,17	41,13 ± 49,88	69,86 ± 77,65	0,59
	D2DR	15,85 ± 39,75	50,35 ± 22,15	49,49 ± 48,54	0,18
	E-cadherin	160,16 ± 71,03	179,37 ± 58,73	168,47 ± 59,03	0,20

Z této tabulky lze vyčíst, že mezi jednotlivými podtypy non-SGST adenomů hypofýzy nejsou v míře exprese studovaných proteinů statisticky významné rozdíly.

## 5.6 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi všemi subtypy hypofyzárních adenomů

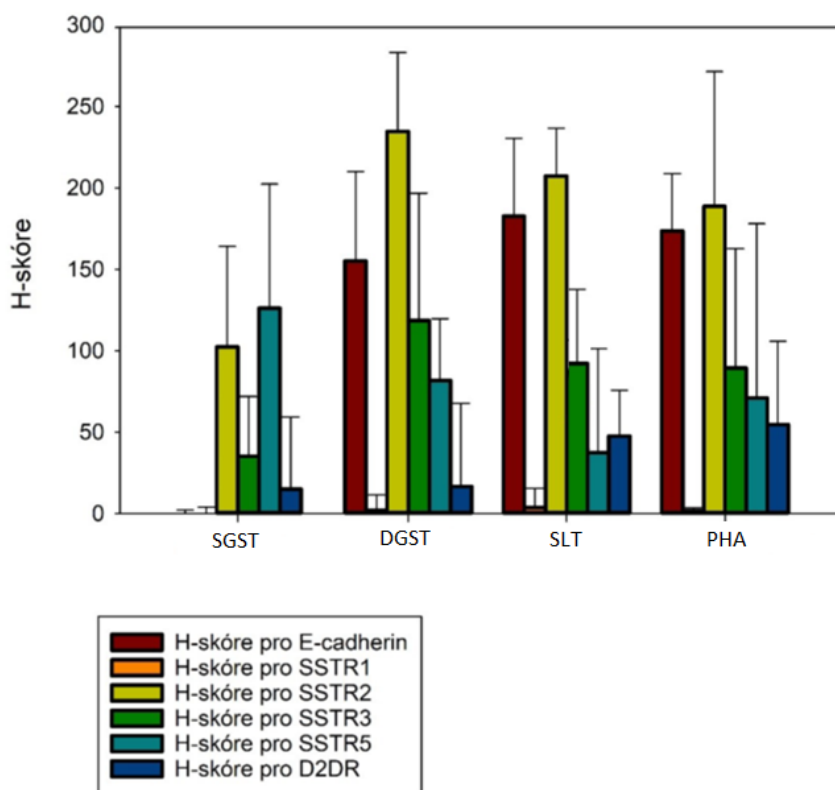
V této analýze jsme porovnávali hodnoty H-skóre studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) mezi všemi podskupinami adenomů hypofýzy, tedy mezi SGST, DGST, SLT a PHA. Výsledky této analýzy jsou přehledně shrnuty do tabulky 7 a názorně je prezentuje obrázek 12.

<b>Tabulka 7.</b>		SGST ( $\mu \pm SD$ )	DGST ( $\mu \pm SD$ )	SLT ( $\mu \pm SD$ )	PHA ( $\mu \pm SD$ )	p hodnota (ANOVA)
Porovnání hodnot H- skóre studovaných proteinů mezi všemi podskupinami adenomů hypofýzy.						
H-skóre	SSTR1	0,27 ± 8,05	1,94 ± 38,76	4,23 ± 16,63	0,87 ± 5,48	0,21
	SSTR2	102,00 ± 80,39	229,58 ± 58,25	211,15 ± 60,05	191,75 ± 88,59	<b>0,01</b>
	SSTR3	26,32 ± 29,97	108,23 ± 74,01	78,09 ± 48,05	95,42 ± 69,35	<b>0,02</b>
	SSTR5	129,15 ± 69,58	79,56 ± 59,17	41,13 ± 49,88	69,86 ± 77,65	<b>0,02</b>
	D2DR	14,96 ± 29,08	15,85 ± 39,75	50,35 ± 22,15	49,49 ± 48,54	0,19
	E-cadh.	0,04 ± 40,02	160,16 ± 71,03	179,37 ± 58,73	168,47 ± 59,03	<b>0,01</b>

Z tabulky můžeme vyčíst, že jednotlivé podskupiny adenomů hypofýzy se statisticky významně lišily v několika hodnotách H-skóre, a to u proteinu SSTR2, SSTR3, SSTR5 a E-cadherinu.

U podskupiny SGST nacházíme mezi všemi porovnávanými podskupinami často buď nejnižší nebo nejvyšší hodnoty H-skóre studovaných proteinů (skupina SGST je tedy nejvíce „vyhraněnou“). Nejnižší hodnoty H-skóre má podskupina SGST u SSTR2, SSTR3 a E-cadherinu, a naopak nejvyšší hodnotu u SSTR5. Dále je z tabulky patrné, že v podskupině SGST je nejvíce exprimován protein SSTR5, za ním poté o něco méně SSTR2, následuje SSTR3 a nakonec E-cadherin, který je v této podskupině adenomů hypofýzy exprimován nejméně. Naopak podskupiny DGST, SLT a PHA mají oproti nádorům ze SGST podskupiny vyšší hodnoty H-skóre, tedy vyšší expresi, u proteinů SSTR2, SSTR3 a E-cadherinu a nižší míru exprese u SSTR5. Mezi podskupinami DGST, SLT a PHA významné rozdíly v míře exprese studovaných proteinů nenalzáme. Celkově u těchto tří zmiňovaných podskupin nacházíme statisticky významně vysoké hodnoty H-skóre u SSTR2 a E-cadherinu.

**Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi všemi subtypy hypofyzárních adenomů**



**Obrázek 12.** Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi všemi podskupinami adenomů hypofýzy (DGST, SLT, PHA a SGST).

## 5.7 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA

Somatostatinové receptory jsou místem účinku pro SSA, tato analýza má zhodnotit, který z podtypů SSTR receptorů má největší význam u léčby SSA. Analyzovali jsme také D2DR receptor, jelikož může ovlivňovat funkci SSTR5 receptoru. Dále nás zajímalo, jestli míra exprese E-cadherinu má nějakou spojitost s terapeutickou odpovědí na léčbu SSA. Za silnou terapeutickou odpověď považujeme normalizaci hladin STH a IGF-1 v krvi a redukci objemu tumoru.



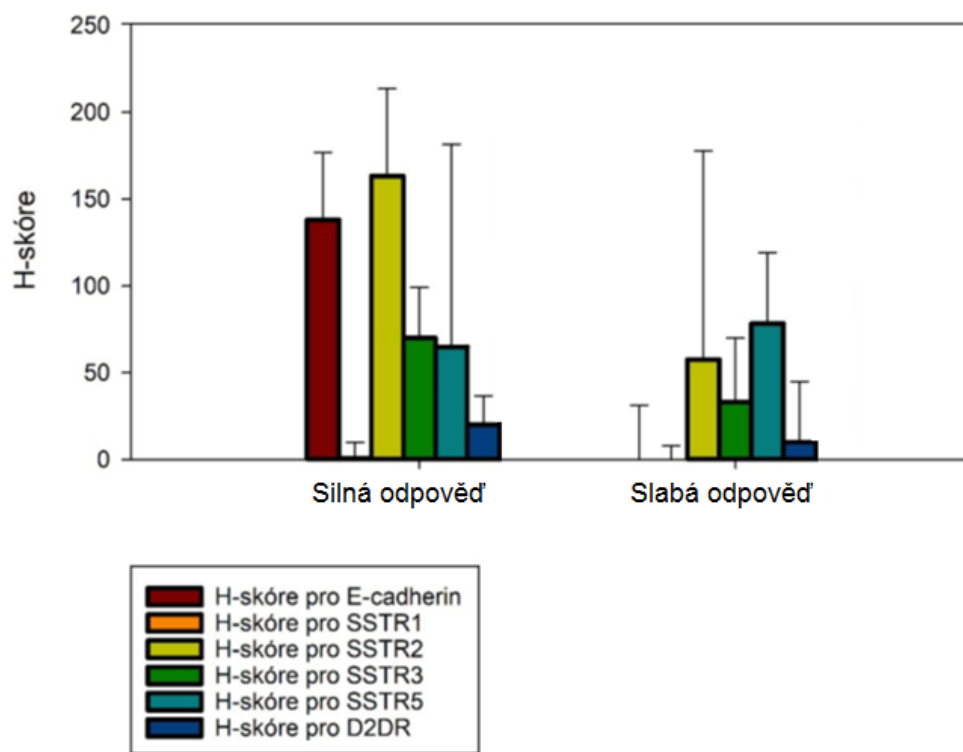
V tabulce 8 a na obrázku 13 jsou přehledně shrnuty výsledky srovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) mezi dvěma skupinami pacientů – se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA.

<b>Tabulka 8.</b>		Silná odpověď ( $\mu \pm SD$ )	Slabá odpověď ( $\mu \pm SD$ )	p hodnota (Stt)
Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA.				
H-skóre	SSTR1	0,71 ± 40,14	0,15 ± 19,53	0,38
	SSTR2	174,32 ± 65,35	90,44 ± 73,25	<b>0,01</b>
	SSTR3	68,12 ± 49,28	29,87 ± 38,97	0,16
	SSTR5	70,13 ± 81,22	81,25 ± 50,03	0,90
	D2DR	18,91 ± 19,26	9,06 ± 29,76	0,79
	E-cadherin	145,21 ± 96,03	0,49 ± 47,60	<b>0,02</b>

U pacientů se silnou terapeutickou odpovědí nalézáme statisticky významně vysokou míru exprese SSTR2 a E-cadherinu a naopak, u pacientů se slabou terapeutickou odpovědí jsou tyto dva proteiny exprimovány málo (E-cadherin), nebo méně (SSTR2). Z tohoto výsledku můžeme usuzovat, že pokud má pacient vyšší míru exprese SSTR2 a E-cadherinu, bude profitovat z léčby SSA více než pacienti s nižší expresí těchto proteinů.

Ve skupině pacientů se slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA byli pouze 2 z podskupiny non-SGST a 8 z podskupiny SGST. Ve skupině se silnou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA bylo 12 pacientů z podskupiny non-SGST a 8 pacientů z podskupiny SGST.

### Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů mezi skupinou pacientů se silnou a slabou odpovědí na léčbu



**Obrázek 13.** Rozdíly v H-skóre studovaných proteinů mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí.

### 5.8 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů a věku mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA v podskupině SGST

V této analýze jsme blíže prozkoumali podskupinu SGST a posoudili míru exprese studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) mezi dvěma skupinami pacientů – se silnou a slabou terapeutickou odpovědí a dále posoudili vliv věku na terapeutickou odpověď. Za silnou terapeutickou odpověď považujeme normalizaci hladin STH a IGF-1 v krvi a redukci objemu tumoru. Výsledky tohoto zkoumání jsou přehledně shrnuty do tabulky 9.

<b>Tabulka 9.</b>		Silná odpověď' ( $\mu \pm$ SD)	Slabá odpověď' ( $\mu \pm$ SD)	p hodnota (Stt)
Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů a věku mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA v podskupině SGST.	Věk (roky)	48,49 $\pm$ 8,05	30,13 $\pm$ 14,18	<b>0,02</b>
H-skóre	SSTR1	0,79 $\pm$ 4,88	0,02 $\pm$ 20,02	0,20
	SSTR2	142,47 $\pm$ 73,88	49,73 $\pm$ 60,34	<b>0,04</b>
	SSTR3	60,51 $\pm$ 41,13	49,38 $\pm$ 44,25	0,81
	SSTR5	122,44 $\pm$ 100,03	92,66 $\pm$ 48,40	0,38
	D2DR	14,12 $\pm$ 19,25	14,26 $\pm$ 28,67	0,69
	E-cadherin	1,87 $\pm$ 37,73	0,53 $\pm$ 3,05	0,68

V tabulce vidíme, že statisticky významnou roli mezi silnou a slabou terapeutickou odpovědí hraje věk pacienta (u mladších pacientů se SGST můžeme očekávat slabou terapeutickou odpověď, a naopak u starších pacientů se SGST můžeme očekávat odpověď silnou). A dále hodnota H-skóre pro SSTR2, která je vysoká u pacientů se silnou terapeutickou odpovědí, a naopak významně nižší u pacientů se slabou terapeutickou odpovědí.

## 5.9 Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů a věku mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA v podskupině non-SGST

V této analýze jsme blíže prozkoumali podskupinu non-SGST a posoudili míru exprese studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) mezi

dvěma skupinami pacientů – se silnou a slabou terapeutickou odpovědí a dále posoudili vliv věku na terapeutickou odpověď. Za silnou terapeutickou odpověď považujeme normalizaci hladin STH a IGF-1 v krvi a redukci objemu tumoru. Výsledky tohoto zkoumání jsou přehledně shrnuty do tabulky 10.

**Tabulka 10.** Porovnání hodnot H-skóre studovaných proteinů a věku mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA v podskupině non-SGST.

		Silná odpověď ( $\mu \pm SD$ )	Slabá odpověď ( $\mu \pm SD$ )	p hodnota (Stt)
	Věk (roky)	52,45 $\pm$ 9,78	51,59 $\pm$ 20,09	0,90
H-skóre	SSTR1	0,32 $\pm$ 20,62	10,73 $\pm$ 61,03	0,21
	SSTR2	202,04 $\pm$ 71,38	178,65 $\pm$ 62,23	0,67
	SSTR3	70,46 $\pm$ 51,66	52,58 $\pm$ 68,23	0,88
	SSTR5	122,50 $\pm$ 60,54	41,05 $\pm$ 29,96	<b>0,01</b>
	D2DR	9,87 $\pm$ 10,35	19,76 $\pm$ 31,35	0,49
	E-cadherin	168,18 $\pm$ 49,26	172,22 $\pm$ 57,11	0,94

Z tabulky můžeme vyčíst, že statisticky významný rozdíl mezi silnou a slabou terapeutickou odpovědí je u hodnoty H-skóre pro SSTR5, kdy u silné odpovědi na léčbu SSA nalzáme vyšší hodnoty H-skóre proteinu SSTR5 a naopak, u slabé odpovědi jsou tyto hodnoty nízké. U věku statisticky významné rozdíly nezjišťujeme.

## 5.10 Souhrn výsledků

Zjistili jsme, že neoadjuvantní léčba SSA první generace nijak neovlivnila míru exprese studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR ani E-cadherinu). Věk pacientů se v době stanovení diagnózy lišil mezi ženami muži – u mužů byl nižší než u žen. Dalším rozdílem mezi pohlavími byla míra exprese proteinu SSTR2, která byla u mužů vyšší než u žen.

Z porovnávání podskupin SGST a non-SGST hypofyzárních adenomů bylo zjištěno, že tyto dvě podskupiny se od sebe statisticky významně lišily hned v několika parametrech. Podskupina non-SGST měla oproti podskupině SGST vyšší míru exprese proteinů SSTR2, SSTR3 a E-cadherinu, a naopak nižší míru exprese proteinu SSTR5. Dále byl v podskupině non-SGST nejvíce exprimován protein SSTR2, o něco méně pak E-cadherin, následně SSTR3 a nejméně SSTR5. V podskupině SGST byl naopak nejvíce exprimován protein SSTR5 následován SSTR2, SSTR3, a nakonec E-cadherin, který byl exprimován nejméně.

Míru exprese jednotlivých proteinů jsme porovnávali v rámci podskupiny non-SGST hypofyzárních adenomů. Zjistili jsme, že mezi jednotlivými podtypy non-SGST adenomů hypofýzy nejsou v míře exprese studovaných proteinů statisticky významné rozdíly.

Míru exprese jednotlivých proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) jsme dále porovnávali mezi všemi subtypy (SGST, DGST, SLT, PHA) hypofyzárních adenomů. Ty se od sebe statisticky významně lišily v míře exprese proteinů SSTR2, SSTR3, SSTR5 a E-cadherinu. Podskupina SGST měla mezi všemi porovnávanými podskupinami často buď nejnižší nebo nejvyšší míru exprese studovaných proteinů (byla tedy nejvíce „vyhraněnou“). Nejnižší expresi měla podskupina SGST u proteinů SSTR2, SSTR3 a E-cadherinu, a naopak nejvyšší u SSTR5. Dále jsme zjistili, že v podskupině SGST byl nejvíce exprimován protein SSTR5, o něco méně SSTR2, následoval SSTR3 a nakonec E-cadherin, který byl v této podskupině adenomů hypofýzy exprimován nejméně. Naopak podskupiny DGST, SLT a PHA měly oproti nádorům z podskupiny SGST vyšší hodnoty H-skóre, tedy vyšší expresi, u proteinů SSTR2, SSTR3 a E-cadherinu a nižší míru exprese u SSTR5. Mezi podskupinami DGST, SLT a PHA jsme významné rozdíly v míře exprese studovaných proteinů nenalezli. Celkově

byly u těchto tří zmiňovaných podskupin statisticky významně vysoké hodnoty exprese SSTR2 a E-cadherinu.

Další analýza nám ukázala, jak se od sebe lišili pacienti se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA ve smyslu míry exprese jednotlivých proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu).

U pacientů se silnou terapeutickou odpovědí jsme našli statisticky významně vysokou míru exprese SSTR2 a E-cadherinu a naopak, u pacientů se slabou terapeutickou odpovědí byly tyto dva proteiny exprimovány málo (E-cadherin), nebo méně (SSTR2). Z tohoto výsledku můžeme usuzovat, že pokud má pacient vyšší míru exprese SSTR2 a E-cadherinu, bude profitovat z léčby SSA více než pacienti s nižší expresí těchto proteinů.

Ve skupině pacientů se slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA byli pouze 2 z podskupiny non-SGST a 8 z podskupiny SGST. Ve skupině se silnou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA bylo 12 pacientů z podskupiny non-SGST a 8 pacientů z podskupiny SGST.

Porovnáním míry exprese studovaných proteinů (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu) a věku u podskupiny SGST hypofyzárních adenomů jsme zjišťovali rozdíly mezi pacienty se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA. Věk pacienta hrál mezi silnou a slabou terapeutickou odpovědí významnou roli (u mladších pacientů se SGST jsme našli slabou terapeutickou odpověď, a naopak u starších pacientů se SGST jsme našli odpověď silnou).

U pacientů se silnou terapeutickou odpovědí jsme našli vysokou míru exprese SSTR2, a naopak významně nižší míru exprese tohoto receptoru u pacientů se slabou terapeutickou odpovědí.

V poslední analýze jsme porovnávali míru exprese studovaných proteinů a věk mezi skupinou pacientů se silnou a slabou terapeutickou odpovědí na léčbu SSA v podskupině non-SGST adenomů hypofýzy. U pacientů se silnou odpovědí na léčbu SSA jsme našli vyšší míru exprese proteinu SSTR5 a naopak, u pacientů se slabou odpovědí byly tyto hodnoty nízké. Věk v tomto případě neměl na terapeutickou odpověď žádný vliv.

## 6. Diskuse

### 6.1 Obecné poznámky k hodnocení exprese proteinů SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu

Imunohistochemické vyšetření SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu bylo provedeno ve všech 110 vzorcích tumorů adenohypofýzy. Celkem bylo tedy imunohistochemicky obarveno a následně vyšetřeno celkem 660 preparátů nezávisle třemi hodnotiteli. Metoda hodnocení ale nebyla zcela exaktní, jednalo se o odhad intenzity pozitivních buněk ve vzorku s přiřazením koeficientu 1 u slabé positivity, 2 u střední positivity a 3 u silné positivity. Hodnocení procentuálního zastoupení pozitivních buněk ve vzorku tumoru bylo rovněž prováděno odhadem. Tento odhad byl ještě náročnější v případech, kdy vzorek tumoru nebyl kompaktní, popř. byl prolut ještě ostrůvky zdravé tkáně, dále v případech, kdy byl příliš velký a musel být prohlédnut v mnoha zorných polích mikroskopu, dále v případě, kdy měl pozitivní buňky o více intenzitách a ty byly navíc navzájem proluté apod.

Stupeň positivity i procentuální zastoupení pozitivních buněk (tedy následně vypočtená celková hodnota H-skóre) mohly být tedy zkresleny subjektivním vnímáním hodnotitele, obzvláště u komplikovanějších případů. Proto poté, co každý z hodnotitelů individuálně a zaslepeně vůči hodnocení ostatních stanovil prostřednictvím výše zmíněných hodnot H-skóre, došlo k následnému odslepení a porovnání výsledků všech tří hodnotitelů. Pokud se některý výsledek H-skóre u jednoho konkrétního vzorku významně odlišoval od ostatních dvou, následovalo posouzení daného vzorku všemi třemi hodnotiteli současně u vícelavého mikroskopu a nalezení konsensu. Věříme, že tímto postupem se podařilo eliminovat velké odchylky způsobené subjektivním vnímáním jedince na co nejnižší možnou úroveň.

### 6.2 Exprese proteinů SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu v kontextu ostatních studií

Námi zjištěná míra exprese **SSTR1** byla u převážné většiny vzorků tumorů nízká. Nejnižší ve srovnání se SSTR2, SSTR3 a SSTR5. Tento výsledek je ve shodě se studií [63]. Nenalezli jsme statisticky významný rozdíl mezi mírou exprese SSTR1 u předlécených a nepředlécených pacientů ani mezi skupinou mužů a žen. Rovněž nebyly nalezeny

statisticky významné rozdíly mezi expresí SSTR1 u pacientů se silnou a slabou odpovědí na léčbu SSA. Tato naše zjištění se shodují s výsledky studií [43,45-47,50,63].

Obecně je ale afinita běžně používaných SSA (oktreotidu a lanreotidu) k SSTR1 nízká, tudíž stanovování míry exprese SSTR1 je v podstatě nedůležité. To by se ale mohlo změnit s extenzivnějším zaváděním pasireotidu do běžné praxe. Celkově v žádné z dalších námi provedených analýz nehrála míra exprese SSTR1 statisticky významnou roli, což koresponduje s celkově nízkou expresí SSTR1 v hypofyzárních adenomech a také s ostatními studiemi [43,45-47,50,63].

Ve dvou studiích [48] a [49] byl popsán rozdíl v míře exprese **SSTR2** u předléčených a nepředléčených pacientů. Konkrétní závěr jejich zkoumání je, že neoadjuvantní terapie SSA může způsobit významný pokles míry exprese SSTR2 v somatotropních adenomech hypofýzy v porovnání s pacienty, kteří neoadjuvantní terapií neprošli, a může vést až ke vzniku rezistence na léčbu SSA. Naše práce ale, obdobně jako studie [43] a [46], tento výsledek nepotvrzuje. Míra exprese SSTR2 se mezi předléčenými a nepředléčenými pacienty v naší práci statisticky významně nelišila.

Při porovnávání odlišností v míře exprese SSTR2 mezi podskupinou adenomů hypofýzy SGST a non-SGST jsme došli ke závěru, že u SGST je míra exprese tohoto receptoru statisticky významně nižší než u non-SGST, což odpovídá i výsledkům několika dalších studií [47,64,65].

Míru exprese SSTR2 jsme dále hodnotili i v rámci souboru non-SGST, který zahrnoval podjednotky DGST, SLT a PHA. Mezi těmito třemi podskupinami adenomů hypofýzy jsme nenalezli statisticky významný rozdíl v míře exprese SSTR2. Následným srovnáváním všech čtyř podjednotek somatotropních adenomů hypofýzy (SGST, DGST, SLT a PHA) jsme našli statisticky významně vyšší míru exprese u DGST oproti SGST, a toto zjištění se shoduje i s výsledky několika dalších studií [47,64-67]. Nejspíše právě z důvodu vyšší míry exprese SSTR2 u DGST bývá terapeutická odpověď na léčbu SSA u DGST významně vyšší. Obecně, míra exprese SSTR2 v tumoru přímo koreluje s mírou terapeutické odpovědi, jak naznačují i studie [43,46,49,64,67-69]. Ovšem existují i pacienti, kteří byli i přes poměrně vysokou míru exprese SSTR2 k léčbě SSA rezistentní [46,64,69]. Je tedy zřejmé, že SSTR2 je sice významným, ale ne jediným faktorem předurčujícím úspěšnost léčby pomocí SSA. Pohled na vztah mezi mírou exprese SSTR2 a odpovědí na léčbu SSA je tedy spíše takový, že nízká míra exprese SSTR2



v tumoru s vysokou pravděpodobností předpovídá slabou terapeutickou odpověď na SSA (tedy negativní prognózu onemocnění), ovšem i vysoká míra exprese SSTR2 není zárukou dobré odpovědi na léčbu SSA.

Naše práce dále nenalezla statisticky významné rozdíly v expresi **SSTR3** mezi skupinou předléčených a nepředléčených pacientů obdobně jako nenalezla rozdíly v expresi tohoto receptoru mezi ženami a muži, čímž se shoduje se studii [48,49]. Statisticky významný rozdíl v míře exprese SSTR3 pozorujeme mezi podskupinou nádorů SGST a non-SGST, kdy u SGST je míra exprese tohoto receptoru významně nižší. Největší rozdíl v míře exprese SSTR3 nacházíme mezi podskupinami SGST a DGST, tento náš výsledek koreluje se studií [47]. Celkově byla míra exprese SSTR3 ve všech našich analýzách významně nižší než SSTR2, tento výsledek odpovídá publikovaným datům [46,50].

Vztah mezi mírou exprese SSTR3 a odpovědí na léčbu SSA se liší mezi různými studii i našimi výsledky. Studie [45] a [49] popisují horší odpověď na léčbu SSA u tumorů s vyšší mírou exprese SSTR3. Studie [43] a [70] ale došly k opačnému závěru – tj. čím vyšší míru exprese SSTR3 tumor má, tím lépe reaguje na léčbu SSA. A nakonec, naše práce v souladu se studii [46] a [48] nenalezla žádný statisticky významný vztah mezi mírou exprese SSTR3 a odpovědí na léčbu SSA.

Naše práce, obdobně jako práce jiných autorů [43,46], nenalezla statisticky významný rozdíl v míře exprese **SSTR5** mezi skupinami pacientů s neoadjuvantní léčbou a bez ní, ani mezi skupinou mužů a žen. Statisticky významný rozdíl jsme ale našli, shodně jako autoři studie [47], v míře exprese SSTR5 mezi podskupinou SGST a non-SGST, kdy u SGST je receptor SSTR5 exprimován významně více než u non-SGST a v rámci podskupiny SGST je míra exprese SSTR5 dokonce nejvyšší ze všech podtypů SSTR.

Názory na význam receptoru SSTR5 u odpovědi na léčbu SSA se ale v dosavadních studiích různí. Výsledkem jedné ze studií [45] je zjištění, že se vzrůstající mírou exprese SSTR5 klesá terapeutická odpověď na léčbu SSA. V naší studii, obdobně jako v několika dalších [43,46,48,49] jsme statisticky významné rozdíly v míře exprese SSTR5 a terapeutickou odpovědí nenalezli. Obecně není vztahu mezi mírou exprese SSTR5 a terapeutické odpovědi přikládán větší význam. To se může do budoucna změnit s širším využitím pasireotidu v léčbě hypofyzárních adenomů nebo také při zavádění nových SSA s vyšší afinitou k SSTR5 do praxe.

V naší práci jsme rovněž zkoumali míru exprese **D2DR**, a to především kvůli jeho možnému vlivu na funkci SSTR5. V žádné z našich analýz jsme neprokázali statisticky významné rozdíly v míře exprese tohoto receptoru. Autoři studií [71,72] ovšem prokázali, že pacienti, jejichž tumory se vyznačovaly vyšší expresí D2DR, lépe reagovali na terapii oktreotidem. Studie [46,50,69] shodně s námi nepotvrdily vliv míry exprese D2DR na terapeutickou odpověď na SSA.

Obdobně jako ve studiích [53,56] ani námi zjištěná míra exprese **E-cadherinu** se statisticky významně nelišila mezi předléčenými a nepředléčenými pacienty, ani mezi skupinou mužů a žen. Statisticky významný rozdíl v expresi E-cadherinu jsme však našli mezi podskupinami SGST a non-SGST, kdy v případě SGST je míra exprese E-cadherinu velmi nízká, a naopak ve skupině non-SGST je značně vysoká. Ve shodě s naším výsledkem jsou i publikace [53] a [56]. Svou nezastupitelnou roli hraje E-cadherin i v ovlivnění terapeutické odpovědi na léčbu SSA, kdy naše studie, obdobně jako některé další [53,56] prokázala, že vyšší míra exprese E-cadherinu v tumoru je spojená s lepší odpovědí na léčbu a naopak, nízká míra exprese E-cadherinu s odpovědí slabou.

### 6.3 SGST versus ostatní podtypy adenomů hypofýzy (shrnutí)

Ve skupině řídce granulovaných somatotropních tumorů (SGST) jsme prokázali statisticky významně nižší míru exprese E-cadherinu, SSTR2, SSTR3, a naopak vyšší míru exprese u SSTR5 oproti ostatním podskupinám somatotropních adenomů hypofýzy (DGST, SLT, PHA; viz tabulka 7).

Podtyp SGST je obecně spojován s vyšší agresivitou a horší terapeutickou odpovědí, což jsme v naší práci nepřímo potvrdili. Jak je popsáno výše, u SGST jsme našli signifikantně nižší míru exprese E-cadherinu, SSTR2, SSTR3, a naopak vyšší míru exprese SSTR5, což v podstatě odpovídá míře exprese těchto proteinů u adenomů hypofýzy se slabou odpovědí na léčbu SSA (tabulka 8 a 9). V podskupině SGST jsme dále zjistili statisticky významně nižší věkový průměr pacientů se slabou terapeutickou odpovědí, a naopak vyšší věkový průměr u pacientů s odpovědí silnou (tabulka 9). Z tohoto výsledku je tedy zřejmé, že pokud dojde ke vzniku SGST hypofyzárního adenomu u mladších pacientů, tento hůře reaguje na léčbu a má tím i horší prognózu, a naopak, u starších pacientů reaguje na léčbu lépe, a má tudíž prognózu lepší.

Celkově se, jak v naší práci, tak mnohých výše zmiňovaných, jeví jako nejvýznamnější faktor pro předpověď léčebné odpovědi SSA míra exprese SSTR2 v tumoru. Toto zjištění v podstatě potvrzuje už dříve známý fakt, že SSA první generace vykazují nejvyšší afinitu právě k SSTR2. Statisticky nejnížší míru exprese SSTR2 nalézáme u SGST, a toto jeho nízké zastoupení vysvětluje slabou odpověď SGST podtypu hypofyzárního adenomu na léčbu SSA.

## 7. Závěr

V naší práci jsme se věnovali charakteristice somatotropních adenomů hypofýzy u československého souboru pacientů s akromegalií, kteří byli zahrnuti do klinického registru RESET v období let 2000 až 2015. Zmiňovaný soubor můžeme nazvat souborem rozsáhlým, jelikož zahrnoval 110 případů, což je vzhledem k vzácnému výskytu tohoto onemocnění vysoké číslo.

Zhodnotili jsme míru exprese proteinů, které mohou mít vliv na terapeutickou odpověď hypofyzárního adenomu na léčbu SSA. Konkrétně se jednalo o somatostatinové receptory typu 1, 2, 3 a 5, dále dopaminový receptor D2 a nakonec E-cadherin. Výsledky této analýzy jsme dali do kontextu klinických údajů získaných z výše zmíněného registru.

Výsledky této práce z převážné části korespondují s výsledky ostatních studií zabývajících se touto problematikou a jsou součástí daleko rozsáhlejší klinicko-patologické studie, provedené MUDr. Jiřím Soukupem, Ph.D. a kol., prezentované v jeho disertační práci „Vybrané prognostické a prediktivní faktory nádorů adenohipofýzy u pacientů s akromegalií“, a dále byly zveřejněny v článku „Predictive and prognostic significance of tumour subtype, SSTR1-5 and e-cadherin expression in a well-defined cohort of patients with acromegaly“.

Můžeme je shrnout takto:

- 1) Ve skupině řídké granulovaných somatotropních tumorů (SGST) jsme prokázali statisticky významně nižší míru exprese E-cadherinu, SSTR2, SSTR3, a naopak vyšší míru exprese u SSTR5 oproti ostatním podskupinám somatotropních adenomů hypofýzy (DGST, SLT, PHA).
- 2) Podtyp SGST je obecně spojován s vyšší agresivitou a horší terapeutickou odpovědí, což jsme v naší práci nepřímo potvrdili.
- 3) V podskupině SGST jsme dále zjistili statisticky významně nižší věkový průměr pacientů se slabou terapeutickou odpovědí, a naopak vyšší věkový průměr u pacientů s odpovědí silnou.
- 4) Celkově se jako nejvýznamnější faktor pro předpověď léčebné odpovědi na SSA jeví míra exprese SSTR2 v tumoru. Toto zjištění v podstatě potvrzuje už dříve známý fakt, že SSA první generace vykazují nejvyšší afinitu právě k SSTR2.

## 8. Seznam použité literatury

- [1] Česká endokrinologická společnost. *Akromegalie*. [on-line] [cit. duben 2023] Dostupné z: <https://www.endokrinologie.cz/cs/akromegalie>
- [2] U lékaře. *Znáte historii akromegalie a její léčby?* [on-line] [cit. duben 2023] Dostupné z: <https://www.ulekare.cz/clanek/znate-historii-akromegalie-a-jeji-lecby-11767>
- [3] MAREK J. *Současné možnosti a perspektivy léčby akromegalie*. Časopis lékařů českých, 2014, vol. 153, s. 131-136.
- [4] ČIHÁK R. *Anatomie 2*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Grada, 2013. 512 s. ISBN: 978-80-247-4788-0.
- [5] NAŇKA O., ELIŠKOVÁ M. *Přehled anatomie*. Čtvrté vydání. Galén 2019. 416 s. ISBN: 978-80-7492-450-7.
- [6] MESCHER A. L. *Junqueirovy základy histologie*. Čtrnácté vydání. Galén, 2018. 558 s. ISBN: 978-80-7492-324-1.
- [7] KONRÁDOVÁ V., UHLÍK J., VAJNER L. *Funkční histologie*. H+H, 2000. 292 s. ISBN: 80-86022-80-3.
- [8] NETUKA D. *Adenomy hypofýzy*. První vydání. Maxdorf, 2019. 256 s. ISBN: 978-80-7345-620-7.
- [9] GANONG W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. Dvacáté vydání. Galén, 2005. 890 s. ISBN: 80-7262-311-7.
- [10] TROJAN S. *Lékařská fyziologie*. Čtvrté vydání, přepracované a doplněné. Grada, 2008. 772 s. ISBN: 80-247-0512-5.
- [11] KITTNAR O. *Lékařská fyziologie*. Druhé, přepracované a doplněné vydání. Grada, 2020. 752 s. ISBN: 978-80-247-1963-4.
- [12] SILBERNAGL S., DESPOPOULOS A. *Atlas fyziologie člověka*. Překlad 8. německého vydání. Grada, 2016. 448 s. ISBN: 978-80-247-4271-7.
- [13] NEČAS E. *Patologická fyziologie orgánových systémů, část II*. Karolinum, 2007. 396 s. ISBN 978-80-246-0674-3
- [14] SOUKUP J. *Vybrané prognostické a prediktivní faktory nádorů adenohipofýzy u pacientů s akromegalií*. Hradec Králové, 2021. Disertační práce. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové.
- [15] EIGLER T., SHOLMO A. *Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones*. Journal of Molecular Endocrinology, 2014, vol. 53, s. 1-19.
- [16] FITZGERALD P., DINAN T.G. *Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article*. Journal of Psychopharmacology, 2008, vol. 22, s. 9-12.
- [17] JONATHAN N., HNASKO R. *Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor*. Endocrinology Reviews, 2001, vol. 22, s. 724-63.

- [18] COOPER O., GREENMAN Y. *Dopamine Agonists for Pituitary Adenomas*. *Frontiers in Endocrinology* (Lausanne), 2018, vol. 9, s. 469.
- [19] WEIS W., KOBILKA B. *The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation*. *Annual Review of Biochemistry*, 2018, vol. 87, s. 897-919.
- [20] KLENER P. *Vnitřní lékařství*. Čtvrté, přepracované a doplněné vydání. Galén, 2012. 1174 s. ISBN: 978-80-246-1986-6.
- [21] SOUČEK M. *Vnitřní lékařství*. První vydání. Grada, 2011. 1788 s. ISBN: 978-80-247-2110-1
- [22] SYRO L.V., ROTONDO F. *Pathology of GH-producing pituitary adenomas and GH cell hyperplasia of the pituitary*. *Pituitary*, 2017, vol. 20, s. 84-92.
- [23] OBARI A., SANO T. *Clinicopathological features of growth hormone-producing pituitary adenomas: difference among various types defined by cytokeratin distribution pattern including a transitional form*. *Endocrine Pathology*, 2008, vol. 19, s. 82-91.
- [24] MORI R., INOSHITA N. *Clinicopathological Features of Growth Hormone-Producing Pituitary Adenomas in 242 Acromegaly Patients: Classification according to Hormone Production and Cytokeratin Distribution*. *ISRN Endocrinology*, 2013, vol. 2013, 723432.
- [25] VILLA C., VASILJEVIC A. *A standardised diagnostic approach to pituitary neuroendocrine tumours (PitNETs): a European Pituitary Pathology Group (EPPG) proposal*. *Virchows Archiv*, 2019.
- [26] RICHARDSON T.E., MATHIS D.A. *Clinical Outcome of Silent Subtype III Pituitary Adenomas Diagnosed by Immunohistochemistry*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2015, vol. 74, s. 1170-1177.
- [27] LOPES M.B. *Growth hormone-secreting adenomas: pathology and cell biology*. *Neurosurgical Focus*, 2010, vol. 29.
- [28] HORVATH E., KOVACS K. *Acidophil stem cell adenoma of the human pituitary: clinicopathologic analysis of 15 cases*. *Cancer*, 1981, vol. 47, s. 761-771.
- [29] MAREK J. *Contemporary options and perspectives in the treatment of acromegaly*. *Časopis lékařů českých*, 2014, vol. 153, s. 131-136.
- [30] RAINS C.P., BRYSON H.M. *Cabergoline. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation*. *Drugs*, 1995, vol. 49, s. 255-279.
- [31] BEVAN J.S. *Clinical review: The antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly*. *The journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005, vol. 90, s. 1856-1863.
- [32] BEN-SHLOMO A., MELMED S. *Pituitary somatostatin receptor signaling*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2010, vol. 21, s. 123-133.

- [33] SHERLOCK M, WOODS C. *Medical therapy in acromegaly*. Nature Reviews Endocrinology, 2011, vol. 7, s. 291-300.
- [34] GADELHA M.R., WILDEMBERG L.E. *Somatostatin receptor ligands in the treatment of acromegaly*. Pituitary, 2017, vol. 20, s. 100-108.
- [35] YAU H., KINAAN M. *Octreotide long-acting repeatable in the treatment of neuroendocrine tumors: patient selection and perspectives*. Biologics, 2017, vol. 11, s. 115-122.
- [36] BURNES C.B., DHILLON S. *Lanreotide autogel: a review of its use in the treatment of patients with acromegaly*. Drugs, 2014, vol. 74, s. 1673-1691.
- [37] COLAO A., AURIEMMA R.S. *Resistance to somatostatin analogs in acromegaly*. Endocrine Reviews, 2011, vol. 32, s. 247-271.
- [38] IACOVAZZO D., CARLSEN E. *Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study*. European Journal of Endocrinology, 2016, vol. 174, s. 241-250.
- [39] ZATELLI M.C., PICCIN D. *Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion*. Endocrine-Related Cancer, 2007, vol. 14, s. 91-102.
- [40] MARAZUELA M., PANIAGUA A.E. *Somatotroph tumor progression during pegvisomant therapy: a clinical and molecular study*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011, vol. 96, s. 251-259.
- [41] COLAO A., AURIEMMA R.S. *The effects of somatostatin analogue therapy on pituitary tumor volume in patients with acromegaly*. Pituitary, 2016, vol. 19, s. 210-221.
- [42] PARAGLIOLA R.M., CORSELLO S.M. *Somatostatin receptor ligands in acromegaly: clinical response and factors predicting resistance*. Pituitary, 2017, vol. 20, s. 109-115.
- [43] CASARINI A.P., JALLAD R.S. *Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment*. Pituitary, 2009, vol. 12, s. 297-303.
- [44] THEODOROPOULOU M., STALLA G.K. *Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice*. Frontiers Neuroendocrinology, 2013, vol. 34, s. 228-252.
- [45] TABOADA G.F., LUQUE R.M. *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*. European Journal of Endocrinology, 2008, vol. 158, s. 295-303.

- [46] VENEGAS-MORENO E., VAZQUES-BORREGO M.C. *Association between dopamine and somatostatin receptor expression and pharmacological response to somatostatin analogues in acromegaly*. Journal of Cellular Molecular Medicine, 2018, vol. 22, s. 1640-1649.
- [47] KISELJAK-VASSILIADES K., XU M. *Differential somatostatin receptor (SSTR) 1-5 expression and downstream effectors in histologic subtypes of growth hormone pituitary tumors*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2015, vol. 417, s. 73-83.
- [48] CASAR-BOROTA O., HECK A. *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*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013, vol. 98, s. 1730-1739.
- [49] PLOCKINGER U., ALBRECHT S. *Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2008, vol. 93, s. 1203-1210.
- [50] NETO L.V., MACHADO O. *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*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2009, vol. 94, s. 1931-1937.
- [51] PECINA-SLAUS N. *Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells*. Cancer Cell International, 2003, vol. 3, s. 17.
- [52] ROY F., BERX G. *The cell-cell adhesion molecule E-cadherin*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, vol. 65, s. 3756-3788.
- [53] VENEGAS-MORENO E., FLORES-MARTINEZ A. *E-cadherin expression is associated with somatostatin analogue response in acromegaly*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, vol. 23, s. 3088-3096.
- [54] ELSTON M.S., GILL A.J. *Nuclear accumulation of e-cadherin correlates with loss of cytoplasmic membrane staining and invasion in pituitary adenomas*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2009, vol. 94, s. 1436-1442.
- [55] FERBER E.C., KAJITA M. *A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus*. Journal of Biological Chemistry, 2008, vol. 283, s. 2691-2700.
- [56] FOUNGNER S.L., LEKVA T. *The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2010, vol. 95, s. 2334-2342.
- [57] COLAO A., HOFLAND L.J. *The role of somatostatin and dopamine receptors as molecular targets for the treatment of patients with pituitary adenomas*. European Journal of Endocrinology, 2007, vol. 156.
- [58] SANDRET L., MAISON P. *Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011, vol. 96, s. 1327-1335.



- [59] HOWLETT T.A., WILLIS D. *Control of growth hormone and IGF1 in patients with acromegaly in the UK: responses to medical treatment with somatostatin analogues and dopamine agonists*. *Clinical Endocrinology*, 2013, vol. 79, s. 689-99.
- [60] COZZI R., ATTANASIO R. *Cabergoline addition to depot somatostatin analogues in resistant acromegalic patients: efficacy and lack of predictive value of prolactin status*. *Clinical Endocrinology*, 2004, vol. 61, s. 209-215.
- [61] PEVERELLI E., TREPPIEDI D. *Dopamine and Somatostatin Analogues Resistance of Pituitary Tumors: Focus on Cytoskeleton Involvement*. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2015, vol. 6, s. 187.
- [62] SOUKUP J., HORNYCHOVA H. *Predictive and prognostic significance of tumour subtype, SSTR1-5 and e-cadherin expression in a well-defined cohort of patients with acromegaly*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, vol. 25, s. 2484–2492.
- [63] LUPP A., NAGEL F. *Reevaluation of sst(1) somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-7*. *Regulatory Peptides*, 2013, vol. 183, s. 1-6.
- [64] BRZANA J., YEDINAK C.G. *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, s. 490-498.
- [65] CHINEZU L., VASILJEVIC A. *Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies*. *Human Pathology*, 2014, vol. 45, s. 71-77.
- [66] MAYR B., BUSLEI R. *Molecular and functional properties of densely and sparsely granulated GH-producing pituitary adenomas*. *European Journal of Endocrinology*, 2013, vol. 169, s. 391-400.
- [67] FOUIGNER S.L., CASAR-BOROTA O. *Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly*. *Clinical Endocrinology*, 2012, vol. 76, s. 96-102.
- [68] KISELJAK-VASSILIADES K., CARLSON N.E. *Growth hormone tumor histological subtypes predict response to surgical and medical therapy*. *Endocrine*, 2015, vol. 49, s. 231-41.
- [69] WILDEMBERG L.E., NETO L.V. *Low somatostatin receptor subtype 2, but not dopamine receptor subtype 2 expression predicts the lack of biochemical response of somatotropinomas to treatment with somatostatin analogs*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2013, vol. 36, s. 38-43.
- [70] CASARINI A.P., PINTO E.M. *Dissociation between tumor shrinkage and hormonal response during somatostatin analog treatment in an acromegalic patient: preferential expression of somatostatin receptor subtype 3*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2006, vol. 29, s. 826-830.

[71] FERONE D., HERDER W.W. *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.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2008, vol. 93, s. 1412-1417.

[72] ZATELLI M.C., PICCIN D. *Dopamine receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtype 5 expression influences somatostatin analogs effects on human somatotroph pituitary adenomas in vitro.* Journal of Molecular Endocrinology, 2005, vol. 35, s. 333-341.