

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

**Analýza cytozolu tkání štítné žlázy a její přínos
v diferenciální diagnostice nodulárních lézí**

MUDr. Richard Pikner

Dizertační práce

Plzeň, 2007

II. Interní klinika
Lékařská fakulta v Plzni , Univerzita Karlova v Praze
a
Fakultní nemocnice v Plzni

Analýza cytozolu tkání štítné žlázy a její přínos v diferenciální diagnostice nodulárních lézí

Obor studia: Vnitřní lékařství

Téma studia: Biologická aktivita nádorových onemocnění

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

Kontakt autora:

MUDr. Richard Pikner

II. interní klinika LF UK FN Plzeň

E. Beneše 13, 305 99, Plzeň

Tel: 377 402 104, pikner@fnplzen.cz

Poděkování :

Rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi za cenné rady a připomínky a především trpělivost při dokončování práce. Práce by rovněž těžko vznikla nebýt pomoci mých spolupracovníků doc.RNDr.Ladislava Pecna CSc. (interpretace statistiky), Jitky Novákové (imunoanalytické vyšetření) a v neposlední řadě i doc. MUDr. Marie Ludvíkové, PhD. (odběr vzorků tkání). Všichni jmenovaní velmi pomohli zdárnému dokončení práce, a proto jim z celého srdce ještě jednou děkuji.

Obsah:

I. Úvod	5
I.1. Epidemiologie uzlů štítné žlázy	5
I.2. Epidemiologie nádorů štítné žlázy.....	5
I.3. Klasifikace uzlů štítné žlázy.....	7
I.4. Patogeneze benigních uzlů štítné žlázy.....	8
I.5. Klasifikace nádorů štítné žlázy a charakteristika	11
I.6. Patogeneze karcinomů štítné žlázy obecná.....	13
I.7. Patogeneze karcinomů štítné žlázy v krocích.....	14
I.7.1. Podpora proliferační aktivity.....	14
I.7.2. Vyřazení přirozené inhibice (faktorů) vzniku maligních klonů.....	24
I.7.3. Inhibice apoptotických mechanismů spolu s expresí imortalizovaného fenotypu.....	26
I.8. Diferenciálně diagnostická problematika	27
I.9. Cytosolové markery u tkání štítné žlázy.....	28
II. Hypotéza	29
III. Metodika	30
IV. Výsledky a diskuse	40
V. Závěry	44
VI. Závěry pro praxi	45
VII. Tabulky a grafy	46
VIII. Literatura	59
IX. Seznam prací autora k problematice štítné žlázy	74
X. Přílohy – kopie publikovaných prací k řešenému tématu (1.autor).....	76

I. Úvod

Uzly štítné žlázy představují nejčastější endokrinní lézi v populaci. Jejich důležitost tkví v nutnosti rozlišení od zhoubného nádoru štítné žlázy. Význam této diferenciální diagnostiky vzrůstá se vzrůstající četností detekce uzlů štítné žlázy zavedením ultrazvukového vyšetření štítné žlázy. Určování parametrů biologické aktivity těchto lézí je předmětem intenzivního výzkumu. Mezi hlavní zkoumané oblasti bezesporu patří faktory proliferační aktivity a angiogeneze. Cílem výzkumu je zlepšení diferenciální diagnostiky, lepší porozumění patofyziologii nádorového bujení a následně i zlepšení prognózy léčených pacientů. Základem diferenciální diagnostiky je vždy histologické, případně imunohistochemické vyšetření. Analýza cytozolu (tkáňového extraktu) může být přínosným analytickým postupem kvalitativní i kvantitativní analýzy.

I.1. Epidemiologie uzlů štítné žlázy

Uzly ve štítné žláze jsou jednou z nejčastějších patologií štítné žlázy a riziko vzniku je 5-10 % během života (life time risk). Jejich vzrůstající incidence v posledních letech je dána především zlepšením v oblasti ultrazvukové diagnostiky. V jodově dostatečně zásobených oblastech se incidence hmatných uzlů pohybuje okolo 4 % v běžné eutyreoidní populaci. (Pacini F) Incidence nehmatných - US (ultrazvukově) zjištěných uzlů se však pohybuje mezi 20 – 76 %, což je souladu s údaji dříve získávaných při pitvách. Incidence uzlů vrůstá s věkem, s jódovým deficitem a historií ozáření a jsou častější u žen. Roční incidence se v USA pohybuje 0,1% (AACE Clinical Practice Guidelines). Většina uzlů je tedy nehmatná, o průměru do 1 – 1,5 cm, přesto jsou klinicky významné, neboť podíl maligních chirurgicky resektovaných uzlů se pohybuje mezi 10 – 30 %. V studii Kang et al byl výskyt nehmatných US diagnostikovaných uzlů 13,4 %, z čehož 28,8% uzlů bylo maligních. I přes vysokou incidenci maligních uzlů zjištěných při chirurgických resekcích štítné žlázy či pitvách je incidence klinicky významného karcinomu štítné žlázy jen 3 - 4 % všech uzlů a mortalita je přibližně 0,4% všech úmrtí na nádorové onemocnění. V této souvislosti se používá termín mikrokarcinom či okultní karcinom štítné žlázy. Tento fakt je podobně jako u karcinomu prostaty způsoben pomalým růstem a nízkým maligním potenciálem. Přesto všechno je včasná diagnóza včetně diferenciální diagnostiky uzlů základem včasného zachytu a úspěšné léčby klinicky významného karcinomu štítné žlázy.

I.2. Epidemiologie nádorů štítné žlázy

Nádory štítné žlázy, přestože patří k nejčastějším endokrinním nádorům, jsou relativně vzácná onemocnění 0,5-1% všech karcinomů. Ve věku mezi 15-45 rokem jde však o 5. nejčastější maligní nádor. Více postihují ženy. (Dvořák J.) Ve světě se incidence karcinomů štítné žlázy pohybuje od 0,5 -10 případů /100 000

obyvateli (Pacini F.). Je zde však trvalý trend v nárůstu incidence od roku 1972 do roku 1992 o 28% (Mazzaferrri E).

Zde je nutné zmínit fenomén Černobylu. Exploze této jaderné elektrárny v dubnu 1986 zvýšila výskyt karcinomů štítné žlázy v dětské dospělé populaci v oblastech postižených spadem radioaktivního jódu.

V letech 1971-85 bylo v Bělorusku zaznamenáno 8 případů (věk 0-14 let), 21 případů (věk 15-19 let), a 1465 případů nad 19 let karcinomů štítné žlázy. V letech 1986 -2000 to bylo již celkem 703!!! Případů (věk 0-14 let), 276 případů (věk 15-19 let) a 7689 případů/rok (věk nad 19 let) (Demidchik E). V roce 186 byl počet karcinomů štítné žlázy u dětí do 15 let 11 nových případů/rok, v roce 1990 již 57 nových případů/rok a maximum bylo dosaženo v roce 1993 – 131 nových případů/rok. Zajímavé zjištění zde bylo, že nejrizikovější skupinou dětí, byla skupina s vyvíjející se štítnou žlázou, tedy především plody (v období maximálního spadu) a malé děti. Incidence karcinomů klesá s věkem postiženého skupiny. Časem došlo rovněž k poklesu incidence solidních méně diferencovaných papilokarcinomů, ve prospěch dobře diferencovaných typických pro dospělou populaci, rovněž méně agresivních.(Leenhardt L;Williams D)

V České republice byl nárůst mezi lety 1984 -1995 o 54,3 % tj. 240 nových případů v roce 1984 a 369 v roce 1995),, přičemž počet úmrtí na tuto diagnózu zůstává prakticky stejný. U mužů došlo k nárůstu mnohem menšímu, přesto je trend jednoznačný. Větší nárůst je však u žen 1984 - 173 případů.....1994 -266 a v roce 1997- 374 nových případů. (IARC). (graf č 1).

Prostá incidence zhoubných nádorů štítné žlázy činí v ČR 7,02 (na 100 000), což je nejvíce ve východní a střední Evropě a tento údaj zhruba koresponduje s incidencí v USA. V celosvětovém měřítku jsou na prvních místech Polynésie (16,19), Island (12,80), Itálie (10,39) a Finsko (10,00), nejmenší incidence na světě na Mauritiu (0,48), v Evropě v Irsku (1,89). Incidence u žen narůstá s věkem a totéž v menší míře platí i u mužů. Incidence u žen dosahuje 14,2 %, u mužů 7,9 % ve věku nad 70 let. Na zvýšené incidenci se zcela jistě podílí zlepšená diagnostika (ultrazvuková spolu s tenkojehlovou aspirační biopsií, což zvyšuje četnost záchytu především mikrokarcinomů). Dále se však zřejmě podílí i narůstající incidence autoimunitních lymfocytárních zánětů štítné žlázy a dostatečné zásobení jódem a jistě i řada zatím neznámých environmentálních a genetických faktorů, (Pecen et al. 1999).

Prevalence tyreoidálního karcinomu (počet žijících pacientů) narůstá rychleji než incidence (počet nově zachycených případů) a odráží skutečnost, že podstatná část pacientů přežívá desetiletí.

Mortalita roční je nízká a činí celosvětově v průměru 5 až 6 úmrtí na milion obyvatel (dle IARC), což koresponduje s všeobecně dobrou prognózou tyreoidální rakoviny. Přežívání pacientů s karcinomem štítné žlázy do 49 let věku (kategorie 40 znamená věk 40 až 49 při záchytu onemocnění) je vynikající a to především u žen. Na rozdíl od mnoha jiných nádorových diagnóz, přežívání pacientů s tyreoidálními malignitami se za posledních 20 let výrazně vylepšilo (log-rank a Wilcoxonův test se signifikancí $p < 0.0001$), pěti a deseti-leté přežití se zvýšilo o cca 20 %. Zatímco incidence stoupá, mortalita klesá díky časné diagnóze, zlepšené léčbě a poklesu incidence anaplastického karcinomu (Pecen et al 1999)

Distribuce podle histologického typu ukazuje, že relativní proporce ve výskytu diferencovaných (folikulárních a papilárních) tyreoidálních malignit v dané geografické oblasti závisí na příjmu jódu v potravě. Celkově papilární karcinomy převažují v oblastech se suficientním příjmem jódu, zatímco folikulární karcinomy jsou spojeny s jódovým deficitem. Suplementace jódu v endemických oblastech vede k zvýšení výskytu papilokarcinomu.

V souboru karcinomů profesora Dvořáka z let 1992 -1996 byl papilární karcinom v 68,8% , folikulární v 18,6 %. Ze zdrojů NOR z let 1977 -1995 bylo zastoupení jednotlivých histologických typů: papilární karcinom v 46,4 % (n=1421) , folikulární v 32,2 % (n=984), anaplastický a medulární karcinom byly zastoupeny přibližně každý 5 %.

I.3 Klasifikace uzlů štítné žlázy

Klasifikace dle příčiny tyreoidálních uzlů (AACE Clinical Practice Guidelines)

Benigní

1. Multinodulární struma
2. Hashimotova tyreoiditida
3. Prostá či hemoragická cysta
4. Folikulární adenom
5. Subakutní tyreoiditida

Maligní

1. Papilární karcinom
2. Folikulární karcinom
3. Hürthle cell karcinom
4. Medulární karcinom
5. Anaplastický karcinom
6. Primární lymfom štítné žlázy
7. Maligní metastatické léze

Dle patogeneze uzlů můžeme rozlišit 5. základních skupin:

1. hyperplastický uzel
2. neoplastický uzel
3. koloidní uzel
4. cystický uzel
5. nodulární Hashimotova tyreoiditida
6. málo časté (pyogenní infekce, de Quervainova tyreoiditida, Riedlova tyreoiditida, parazitární, amyloidóza, histiocytóza X, granulomatóza z plazmatických buněk)

I.4. Patogeneze benigních uzlů štítné žlázy

Základními patologickými faktory indukující vznik uzlů jsou strumigeny a karcinogeny. Mezi strumigeny patří: jód, lithium, ClO_4^- , TcO_4^- , BF_4^- , thiokyanáty (SCN^-), Thioamidy, anilinové deriváty (včetně

tolbutamidu, sulfguanidinu, sulfmetoxazolu... v terapeutických dávkách nejsou strumigení), deriváty fenolu, flavonoidy, deriváty DDT, DDD, chlorované bifenyly. Mezi chemické karcinogeny patří kromě radioaktivních izotopů jódu: thiourea, mathimazole, etylthiourea(ETU)- degradační produkt fungicidu, herbicid aminotriazol, acetylamnofluoren (insekticid), metylenbenzamin, oxydianilin, nitrosaminy, nitrosurea (protinádorový lék) (Salabe G.)

I.4.A.Hyperlastický uzel

Difúzní hyperplastická struma vzniká nejčastěji na podkladě jodového deficitu, ale na vzniku se mohou podílet i další strumigeny a karcinogeny viz výše. V experimentálních studiích byla prokázána dvoufázová reakce na strumigení podnět:

1. vaskulární reakce
2. replikace folikulárních buněk

Ad 1. Buňky štítné žlázy jako odpověď na stimulaci TSH produkují VEGF (vascular endothelial growth factor) a VPF (vascular permeability faktor). Ty se pak váží na své specifické receptory endoteliálních buněk a indukují neovaskularizaci, tj. vznik nových kapilár a současně i indukují proteolytické enzymy, které umožňují expanzi do stromální matrix.(Wollman SH)

Ad 2. Pak následuje druhá fáze- replikace folikulárních buněk a tvorba nových folikulů. Nové folikuly vznikají pravděpodobně vydělením několika buněk z mateřského folikulu a dále se již množí monoklonálně. To také vysvětluje i vznik různých okrsků (studených, horkých uzlům koloidních a pseudocystických) v jedné hyperplastické štítné žláze. Na druhé straně je možná i varianta , že vzniká celá řada identických folikulů a ty jsou až následně modifikovány a vznikají monoklony. Neoplazie jsou pak monoklonální , vzniklé z jedné buňky.(Thomas GA)

Rozhodující roli v indukci hyperplazie hraje stimulace TSH receptoru a následná stimulace systémů:

- a) cAMP/proteinkináza A: vzniklá proteinkináza A se štěpí na aktivní C komponentu, která jádře pomocí CRE (C component responsive element) indukuje replikaci specifických genů zodpovědných za proliferaci tyreocytů
- b) Aktivace fosfolipázy Cmá minoritní efekt až při intenzivní stimulaci TSH receptorů
- c) Aktivace fosfolipázy A2 ... ovlivnění intracelulárního metabolismu prostaglandinů má rovněž minoritní efekt.

Hlavní cestou je tedy stimulace TSH receptoru zvenčí či bodovým mutacemi TSH receptoru, cAMP, Gs proteinů.

Nedílnou součástí vzniku hyperplazie štítné žlázy jsou tedy vzájemné interakce: autokrinní, parakrinní či hormonální. Mezi hormonální vlivy patří TSH, hCG, GH (growth factor), EGF (epidermal growth factor), jód. Autokrinní a parakrinní stimuly (faktory) jsou produkovány ve stromatu (20% tkáňového objemu štítné žlázy) IGF-I a II (insulin like growth factor), basic FGF, endothelin I, TGF beta a cytokiny z infiltrujících

lymfocytů jako jsou IL-1, IL-6(interleukiny), TNF (tumor necrosis factor), IFN- gamma (interferon).(Tamai KT)

I.4.B. Koloidní uzel:

Etiologie vzniku koloidní uzlů dodnes není jednoznačná, když je zřejmé, že se jedná o fokální poruchu rovnováhy mezi produkcí a sekrecí Tg (tyreoglobulinu) do folikulu a jeho zpětnou pinocytózou a degradací. Jedním z patogenů byl i exces jódu, klinicky však funguje až při extrémním přebytku například podáním Lugolova roztoku, který dokáže přeměnit hyperplastickou strumu v strumu koloidní. V současné době je nejvíce akceptována teorie patologického zvýšení obsahu polymerizovaného Tg. Tento polymer vzniklý z několika molekul Tg se i za normální situace vyskytuje v 10-20% obsahu koloidu folikulu a jeho funkcí je zřejmě udržovat přiměřený intrafolikulární tlak. U koloidní strumy dochází k jeho kumulaci, jejíž mechanismus zatím není znám. (Salabe G.)

I.4.C.Cystický uzel:

Pravé cysty jsou ve štítné žláze vzácné, zde se jedná většinou o pseudocysty a nacházíme je u 15-40% všech uzlů. Tyto pseudocysty vznikají v místě nekrózy a kolikvace původních struktur štítné žlázy a na jejich vzniku se významně podílí zvýšená angiogeneze a permeabilita kapilár a apoptotické působení VEGF a VPF.

I.4.D.Nodulární Hashimotova tyreoiditida:

Jde o minimální procento případů, většinou se jedná o difúzní proces. Etiologie modulárního průběhu není známa. Je zde asociace mezi lymfocytární infiltrací a rizikem vzniku lymfou štítné žlázy.(Salabe G.)

I.5. Klasifikace nádorů štítné žlázy a charakteristika

Bylo navrženo několik klasifikačních schémat, z nichž se nejvíce osvědčila klasifikace založená na doporučeních WHO a AFIP viz následující tabulka.

Typ nádoru	Benigní	Maligní
EPITELOVÉ z folikulárních buněk <i>dobře diferencované</i> <i>středně diferencované</i> <i>špatně diferencované</i> C-buněk	adenomy	folikulární a papilární karcinom inzulární karcinom anaplastický karcinom medulární karcinom
NEEPIELOVÉ Mezenchymové Neuroektodermové	angiom, lipom aj. neurinom, paragangliom	maligní lymfom angiosarkom
BRANCHIOGENNÍ (ze zbytků branchiogenních struktur)	ektopický thymom	SETTLE CASTLE

Vysvětlivky: **SETTLE**, vřetenobuněčný epiteliální tumor s diferenciací podobnou thymu, angl. spindle epithelial tumor with thymus-like differentiation; **CASTLE**, karcinom vykazující thymu podobné elementy, angl. carcinoma showing thymus-like differentiation.

I.5.A. Folikulární karcinom (FC)

představuje asi 15% všech zhoubných nádorů štítné žlázy. Jeho incidence je vyšší v oblastech endemických v souvislosti s deficitem jódu. Vyskytuje se spíše ve vyšším věku, převažuje u žen a má tendenci k hematogennímu metastazování. (Němec et al) Podle jeho makroskopického vzhledu rozlišujeme dvě formy FC: minimálně invazivní a široce invazivní. Prvně jmenovaná forma je makroskopicky opouzdřená a pouze histologicky prokážeme hlavní kritéria malignity, tj. invazi přes pouzdro a/nebo průnik do krevních cév ležících vně pouzdra. Minimálně invazivní FC má výbornou prognózu na rozdíl od široce invazivního FC, který vykazuje částečné nebo úplné chybění pouzdra a rozsáhlou angioinvazi společně s invazivním šířením do přilehlé tyreoidální tkáně. Tato široce invazivní varianta většinou není diagnosticky obtížná na rozdíl od minimálně invazivního FC, který je někdy špatně odlišitelný od folikulárního adenomu, a to i při mikroskopickém vyšetření nádoru ve velkém rozsahu. Podle vzhledu a uspořádání nádorových folikulárních buněk existuje několik podtypů FC, z nichž poměrně častá je onkocytární varianta. (Williams et al)

I.5.B.Papilární karcinom (PC) (Rosai et al, Ludvíková et al)

je zhoubný nádor vycházející z folikulárních buněk, představuje asi 75% všech maligních nádorů štítné žlázy a vyskytuje se v každém věku. Vyznačuje se časným metastazováním do krčních lymfatických uzlin. Kromě sporadických případů se vyskytují rovněž agresivnější familiární formy. Rizikovými faktory pro vznik PC je ozáření hlavy a krku (z terapeutických i náhodných důvodů), Hashimotova tyroiditida či familiární adenomatózní polypóza nebo Cowdenova choroba. Histologicky je PC charakterizován papilární architektonikou a/nebo typickým vzhledem jader nádorových buněk, který spočívá v jejich projasnění, hypochromázii, v přítomnosti jaderných zářezů a intranukleárních inkluzí, přičemž všechny tyto změny nemusí být exprimovány ve všech nádorových buňkách. Dále ve stromatu bývají přítomna tzv. psamomatozní tělíška, což jsou mikrokalcifikace odumřelých nádorových buněk. Všechny vyjmenované znaky (s výjimkou papilárního uspořádání) jsou klíčové pro diagnózu tyreoidálního PC. Paradoxně podmínkou pro diagnózu není přítomnost papil, navzdory tomu, že od nich byl odvozen název tohoto tumoru. Jsou však známy i varianty PC, které mají pouze typické folikulární uspořádání nádorových buněk s charakteristickými jadernými znaky (tzv. folikulární varianta PC). Termín papilární karcinom je tedy nutné chápat jako nozologický, označující celou skupinu nádorů štítné žlázy se stejnou patogenezi a stejným nebo podobným klinickým chováním. Přítomnost pouzdra není rozhodující pro diagnózu PC. Některé další typy PC jsou papilární mikrokarcinom, onkocytární PC, difúzní sklerozující PC a papilokarkinomy z vysokých nebo kolumnárních buněk. Poslední tři jmenované typy mají dle literárních údajů agresivnější chování.

I.5.C.Špatně diferencovaný karcinom

představuje skupinu zhoubných nádorů štítné žlázy, které podle histologického vzhledu a dignity leží na pomezí mezi dobře diferencovanými malignitami z folikulárních buněk a anaplastickým karcinomem. Inzulární varianta se vyznačuje typickým ostrůvkovitým uspořádáním uniformních menších nádorových buněk.

I.5.D.Anaplastický (nediferencovaný) karcinom

je agresivní tumor rozsáhle invadující štítnou žlázu a často prorůstající i do jejího okolí. Reprezentuje asi 5% malignit štítné žlázy. Mikroskopicky jsou nejčastější varianty vřetenobuněčná (sarkomatoidní) a obrovskobuněčná. Existence původně vyčleněné malobuněčné varianty byla zpochybněna po zavedení imunohistochemie, neboť téměř všechny nádory z této skupiny byly reklasifikovány jako maligní lymfom, medulární nebo insulární karcinom. (Rosai et al)

I.5.E.Medulární karcinom (MC) štítné žlázy (Rosai et al)

je tumor vzniklý nádorovým zvratem C-buněk produkujících kalcitonin. Téměř 80% případů představuje sporadický medulární karcinom, který se vyskytuje spíše u starších lidí bez preference pohlaví. Zbývající část medulárních karcinomů jsou familiární formy vyskytující se hlavně u mladých jedinců. Familiární MC jsou multicentrické a bilaterální, vznikají na pozadí C-buněčné hyperplazie spojené s germinální mutací RET-genu a často se vyskytují v rámci syndromu MEN (multiple endocrine neoplasia). Mikroskopicky je

tvoreň z buněk variabilního polygonálního nebo vřetenitého tvaru a vyznačuje se přítomností amyloidu ve stromatu.

I.5.F. Onkocytární (oxyfilní) tumory štítné žlázy

se vyskytují jako varianty výše jmenovaných neoplázií. Nádorové buňky vykazují typickou eosinofilní přeměnu podmíněnou nahromaděním mitochondrií v cytoplasmě, což lze spolehlivě prokázat imunohistochemicky s protilátkou proti mitochondriálnímu antigenu. Původní názor, že všechny oxyfilní tumory štítné žlázy jsou maligní a agresivní se nepotvrdil, neboť nepochybně benigní onkocytární adenomy existují. Onkocytární nádory jsou trvale předmětem výzkumu z patogenetického i prognosticko-prediktivního hlediska (Maximo et al).

I.5.G. Primární maligní lymfomy štítné žlázy

vznikají většinou na podkladě Hashimotovy thyroiditidy, jsou nejčastěji B-typu a vyznačují se příznivým biologickým chováním. Velká část lymfomů byla před nástupem imunohistochemie mylně diagnostikována jako anaplastické karcinomy. Primární sarkomy štítné žlázy jsou extrémně vzácné, nejčastěji z nich se vyskytuje angiosarkom.

I.6. Patogeneze karcinomů štítné žlázy obecná:

Vznik jak benigních tak maligních nádorů štítné žlázy je dán kaskádou změn exprese či funkce onkogenů a tumor supresorových genů. Kromě lymfomu a medulárního karcinomu vznikají karcinomy štítné žlázy z tyreocytů (folikulárních buněk). Na celé patogenezi se podílí celá řada růstových faktorů, které podporují proliferaci, immortalizaci, metastazování a blokují kontrolní mechanismy včetně apoptózy. Výčet těchto faktorů nemůže být díky probíhajícímu intenzivnímu výzkumu nikdy úplný, přesto uvádím alespoň pro ilustraci následující seznam:

Faktory podporující nádorovou proliferaci

TSH	Stimuluje růst tyreocytů a produkci hormonů
GSP	Podporují vazbu TSH receptor a ligand a tím zvyšují koncentraci cAMP
EGF	Inhibuje diferenciaci, podporuje proto-onkogeny
VEGF	Podpora růstu nádoru pomocí zvýšením intenzity angiogeneze
IGF-I	Podporuje proliferaci tyreocytů
MET	Významná tyreoidální tyrosine-kináza váže HGF a stimuluje proliferaci tyreocytů
MYC	Nuclear transcription factor účastní se kontroly růstu a diferenciaci
RAS	Vázán na membránu zprostředkovává signály z receptoru pro tyrosine kinázu na kaskádu MAP kinázy
BRAF	Cytosolová serine/threonine kinase, váže se na RAS a aktivuje MAP kinázovou kaskádu
RET/PTC	Tyrosine-kináza receptor, normálně váže TGF-beta podobné neurotrofní faktory
TRK-T	Peripheral nervous system tyrosine kináza- normálně váže nerve growth faktor
cyclin D1	Mediátor progresu buněčného cyklu, aktivuje cyclin dependentní kinázu, fosforyluje Rb
TPO	Katalyzuje oxidaci jódu, jodaci tyreoglobulinu , a tvorbu jodotyroninu
DAP4	Exopeptidáza popsána při aktivaci T-buněk, zvýšená aktivita u mnoha malignit

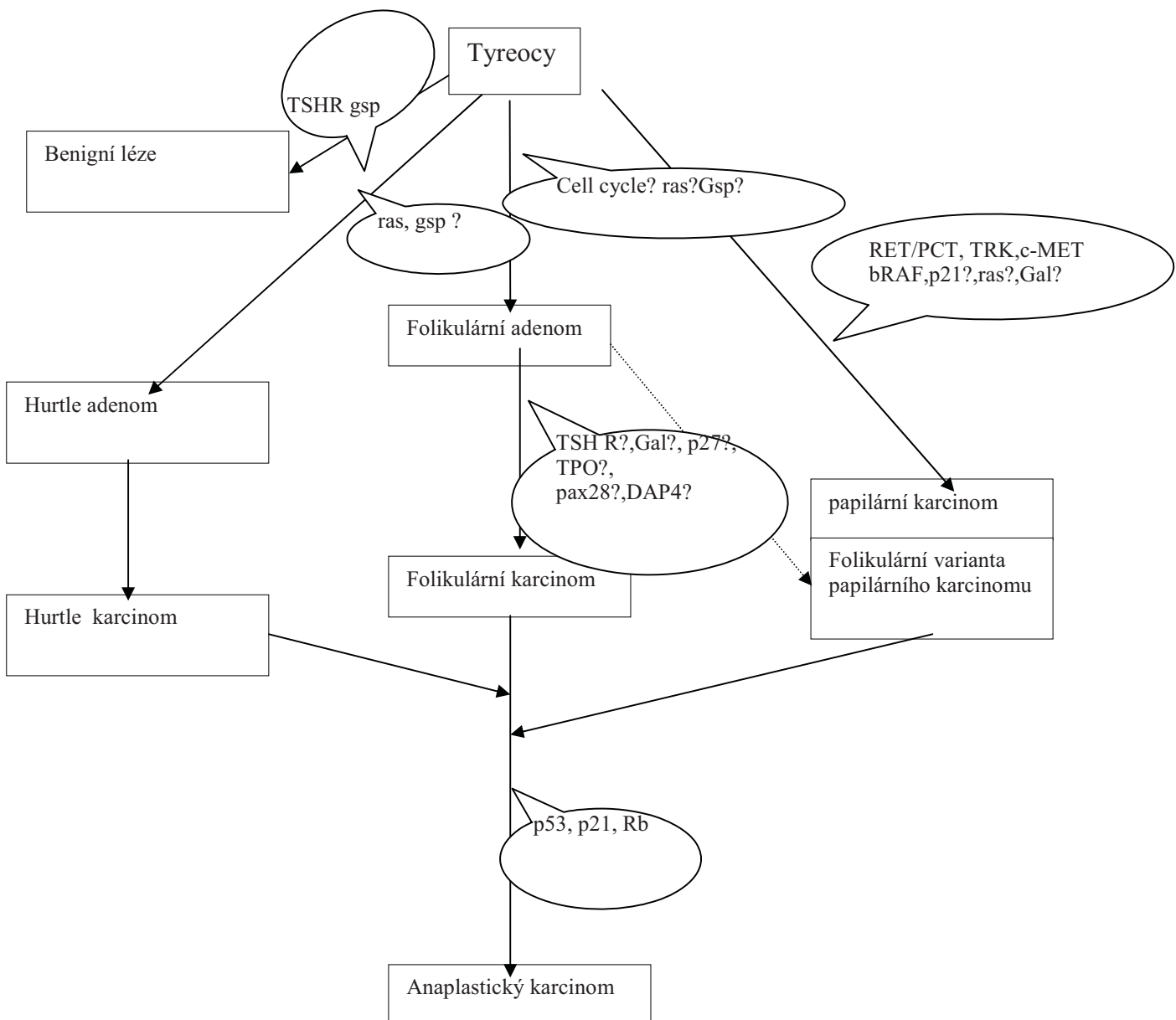
Faktory bránící proliferaci nádorů

- TGF-beta Blokuje na cAMP závislou proliferaci tyreocytů CDK a napomáhá apoptóze
- p21 Inhibitor Cyclin dependentní kinázy, efektor p53-mediovanou zástavou buněčného cyklu v G1 fázi
- p27 Inhibitor Cyclin dependentní kinázy, kontroluje přechod z G1 do S fáze
- Rb Fosforylovaná forma umožňuje průběh buněčného cyklu
- p53 Transkripční faktor, esenciální mediátor zástavy buněčného cyklu jako odpověď na genetické poškození
- E-Cadherin Glykoprotein podporuje buněčnou adhezi a udržuje integritu epitelu, blokuje invazi
- Galectiny Karbohydráty vázající protein podporující vzájemné buněčné interakce včetně s matrix
- CD44 Membránový glykoprotein spojený s interakcemi buňky a matrix

Faktory ovlivňující buněčnou imortalitu a smrt

- Telomerase Reverse transcriptase udržuje buňku živou prodlužováním chromozomálních telomer
 - Rodina Bcl proteinů pro- či anti-apoptická funkce
 - Fas/Fas-L Ligand/receptor systém podporuje apoptózu skrze aktivaci kaspáz
 - PTEN Lipid phosphatase pomocí PI-3K či Akt/PKB způsobuje apoptózu či G1 arest
- (Fagin JA et al, Dumont JE et al, Farid NR et al, Frauman AG et al, Said S et al)

Karcinogeneze u štítné žlázy je mnohastupňový proces, jehož základní schéma následuje



Během tohoto mnohostupňového procesu je nejprve základem je aktivace ras onkogenu bodovou mutací. Výsledkem je pak trvalá stimulace proliferace. Por vznik papilárního karcinomu je typický nález mutace ret genu (RET/PCT 1-8). RET/PCT 1 je paracentrická inverze chromozómu 10 a výsledkem je trvalá fosforylace tyrosinu v doméně tyrosine kinázy.... trvalá tyrosine-kinázová aktivita. Dále je to aktivace trk onkogenu, vedoucí k tvorbě receptoru pro Nervous growth hormone.

Ve finále pro přechod na anaplastickou formu karcinomu je nutný další krok a to inaktivace proteinu p53, p21 či Rb (retinoblastoma gene) potentního inhibitoru ke kontrole buněčného cyklu. (Segev et al)

I.7. Patogeneze nádorů štítné žlázy v krocích

1. Podpora proliferační aktivity :
 - a. růstové faktory
 - b. angiogeneze
 - c. onkogeny
 - d. inhibice kontroly buněčného cyklu
2. Vyřazení přirozené inhibice (faktorů) vzniku maligních klonů
3. Inhibice apoptotických mechanismů spolu s expresí imortalizovaného fenotypu.

Tyto jednotlivé složky se vzájemně prolínají a, kombinují a podporují. Některé změny jsou typické pro jednotlivé histologické typy nádorů štítné žlázy

I.7.1.A. Podpora proliferační aktivity

Proliferace buněk je ovlivňována specifickými pozitivními nebo negativními signály vyslanými jinými buňkami (parakrinní regulace) nebo vlastní buňkou (autokrinní regulace). Jsou nutné k tomu, aby cílová buňka buď prošla nebo neprošla kontrolním G1 úsekem do další fáze buněčného cyklu.

Nositelem těchto signálů jsou růstové faktory (growth factors GF), které se nazývají rovněž cytokiny (glykosylované proteiny). Jejich účinek začíná navázáním ke specifickému membránovému receptoru s enzymatickou aktivitou. Výsledkem této vazby je vytvoření signálu, který je přenesen do jádra k příslušnému úseku DNA (myc, fos a jun protoonkogenů nebo genů pro cykliny a Cdk proteiny) a zajistí jeho následnou transkripci. Tímto způsobem je ovlivňována nejen proliferace, ale rovněž buněčný růst a diferenciaci. V současné době je známo kolem 50 růstových faktorů. Některé růstové faktory ovlivňují buněčnou proliferaci negativně. K onkogenní aktivitě mají vztah zejména destičkový růstový faktor (PDGF), epidermální růstový faktor (EGF) a transformační růstové faktory α a β (TGF- α , TGF- β) a rodiny IGF faktorů.

Další přenos signálu zajišťují proteinové kinázy, které se vyskytují buď ve formě membránových receptorů růstových faktorů nebo cytoplasmatických kináz a ras proteinů. Nejznámější a nejstudovanější

membránové receptory jsou zejména receptory pro EGF a PDGF. Ras proteiny slouží k přenosu zevních signálů iniciovaných růstovými faktory k signálnímu transdukčnímu systému. Mutace ras pro-onkogenu na onkogen vede k produkci mutantního trvale aktivovaného ras proteinu. Asi 15% lidských maligních nádorů obsahuje mutované ras geny.

Mezi inhibiční faktory proliferace patří jednak nedostatek růstových faktorů, jednak přítomnost produktů onkosupresorových genů, které kódují inhibiční proteiny. Mutace těchto genů vyvolávají absenci inhibičních proteinů následovanou neadekvátní proliferací, která vyústí až ve vznik nádorů. Zkratky příslušného tumor supresorového genu jsou většinou složeny z prvních písmen slov, která označují nádor, vzniklý mutací tohoto genu, např. retinoblastom-Rb gen, Wilmsův nádor-WT-1 gen, polyposis adenomatosa coli-APC gen, BRCA gen, NF-gen, VHL gen apod.

Růstové faktory:

Jejich nadprodukce či alterace signálních cest vede ke stimulaci růstu a diferenciaci specifických tkání a předpokládá se, že se jedná o iniciální fázi geneze nádorového onemocnění. Některé signály kromě stimulace růstu rovněž vedou ke ztrátě schopnosti diferenciaci a tedy i ke ztrátě funkce tyreocytů jako buněk produkujících tyroxin a trijodotyronin. Pokud však nedojde k dalším změnám, vyvíjí se prostá hyperplazie štítné žlázy, jak již bylo zmíněno viz výše. Stimulace růstovými faktory je jak buňkami stromatu, či auto nebo parakrinní. Mezi základní růstové faktory nádorů štítné žlázy patří :

TSH-R (TSH receptor) : 7 transmembrane domain, patří mezi růstové receptory a jeho aktivace zvnějšku či mutací vede ke intenzivní stimulaci růstu pomocí cAMP/proteinkináza A systému.

Gs proteiny: proteiny kódované gsp genem, tři podjednotky (alfa, beta, gama) přenáší signál z TSHR na adenylcyklázu a dále protein kinázu A, které následně v jádře aktivují kaskádu dějů vedoucích ke stimulaci růstu

EGF (epidermal growth factor)

Stimuluje specifickou kinázovou kaskádu skrze MAPK (mitogen activated protein kinase), která fosforyluje ribozomální S6 kinázu, což na jedné straně stimuluje růst tyreocytů a na druhé blokuje diferenciacní efekt TSH (uptake jódu, produkci hormonů), přitom naopak TSH nedeaktivuje kinázovou kaskádu EGF. Nadprodukce EGF je typická u hyperfunkčních uzlů, papilárního a anaplastického karcinomu. Rovněž může dojít k nadprodukci ligandu EGF-R (EGF receptoru), kódovaným c-erbB1 genem, což pak vede ke zvýšení počtu EGFR či následnému zvýšení aktivace met onkogenu. Tyto léze jsou pak klinicky více agresivní.

IGF-1

Insulin-like growth factor (IGF-1) je exprimován stromálními buňkami štítné žlázy a plní autokrinní roli ve stimulaci proliferace tyreocytů. Ve zvýšené míře lze nalézt jak u adenomů tak i karcinomů. IGF 1 podobně jako TSH indukuje proliferaci a stimuluje diferenciaci svoji, ale také podporuje růst stimulací angiogeneze a neovaskularizace, což bylo prokázáno na myších modelech (Bergstrom JD)

I.7.1.B.. Angiogeneze

Během embryogeneze vnikají nové cévy 2 různými procesy:

vaskulogenezi a angiogenezi. Vaskulogeneze je iniciální proces vedoucí k tvorbě nových cév. Během tohoto procesu migrují prekursorové endoteliální buňky (angioblasty) na určené místo, diferencují se a tvoří základní kostru, která dává nakonec vznik primárnímu kapilárnímu plexu. (Noden DM et al)

Další růst, expanze a vývoj těchto primitivních cév je nazýván angiogenezou. Angiogeneze je charakterizována pučením cév z konců již pre-existujících či longitudinálním dělením existujících cév periendoteliálními buňkami (intususcepce). V dalším vývoji aktivované endoteliální buňky dále migrují a proliferují a vytváří tak nové cévy. Ty pak jsou různě obklopeny vrstvami periendoteliálních buněk, pericytů, u malých cév a buňkami hladkého svalstva u velkých cév (vaskulární myogeneze) (Hirschi KK et al). Nakonec dochází k dalším funkčním modifikacím velkých cév (arteriogeneze, kdy cévy získávají tenký plášť svaloviny spolu elastickými a vazomotorickými elementy.

Vaskulogeneze a angiogeneze jsou tedy komplexní procesy, jejichž správný vývoj je regulován komplexní soustavou angiogeních a antiangiogeních faktorů, které interagují s celou řadou různých buněk a tkání.

Endoteliální buňky tedy samy pro novotvorbu nestačí a pro kompletní novotvorbu je nezbytná jejich součinnost s peri-endoteliálními buňkami a matricí.

Vaskulogeneze:

Prvním krokem je diferenciace pluripotentního embryonálního prekursoru na hemangioblast, což je potencováno Fibroblasty stimulujícím faktorem (FGF) (Kraus K, et al.). Hemangioblasty vytvářejí malé ostrůvky, kde dále diferencují. Z okrajových buněk vznikají prekursorové endoteliální buňky, zatím co z prostředních vznikají hematopoetické prekursorové a mají proto některé společné znaky jako CD31, CD34 a receptor tyrosin kinázy typu-2 pro VEGF (Yamaguchi TP et al.). Diferenciace angioblastů je dále podporována VEGF, VEGFR2 a bazickým fibroblasty stimulujícím faktorem (bFGF) (Ferrara N. et al, Carmeliet P. et al, Shalaby F et al,).

Angiogeneze:

Molekulární bázi angiogeneze mnohastupňový proces. Počáteční vazodilatace cév spolu se zvýšenou permeabilitou a degradací okolní matrix umožní aktivovaným endoteliím migrovat ven a tvořit nové lumina. Tyto nově tvořené cévy (pučením) jsou podporovány okolní sítí periendoteliálních buněk a matrice. Vazodilatace, zvýšená permeabilita cév a degradace okolní matrice jako odpověď na NO (oxid dusný) je

prvním krokem angiogeneze. VEGF, jehož transkripce je částečně regulována NO (Kimura H et al) vede také ke zvýšení cévní permeability, redistribuci adhezivních molekul (platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 a vascular endothelial (VE)-cadherin). (Eliceiri BP et al, Gale NW et al). Extravazace sérových proteinů, indukovaná VEGF, je pak základem strukturální podpory nově tvořených cév. VEGF inicializuje shromáždění endoteliálních buněk, PDGF-BB kontroluje pericyty a buňky hladké svaloviny, zatímco angiopoetin-1(Ang1) a TGF-beta 1 stabilizují nově vytvořené cévy .

Degradace extracelulární matrice je výsledkem práce celé řady proteináz, které nejen připravují prostor pro migrující endoteliální buňky, ale rovněž uvolňují růstové faktory včetně bFGF, VEGF a insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Celkem již bylo identifikováno více než 20 matricových metaloproteináz (MMPs), které se spolupodílejí na angiogenezi, tumorogenezi a buněčné proliferaci. . MMPs mají klíčovou postavení v degradaci extracelulárních membrán a bazální membrány.(Carmeliet P et al, Nelson AR et al)

Nádorová angiogeneze- neovaskularizace:

U dospělého jedince je angiogeneze vysoce potlačena a jen asi u 0,01% endoteliálních buněk probíhá dělení. Většina nádorů u lidí perzistuje in situ po dlouhé měsíce až roky bez známek cévní novotvorby. Neovaskularizace začne, jakmile dojde ke změně fenotypu u skupiny buněk tzv. angiogennímu zvratu (angiogenic switch) . V prevaskulární fázi je nádor málokdy větší než 2-3 mm a obsahuje asi okolo 1 milionu buněk , jejichž výživ je zajištěna prostou difúzí. Limitace zásobení živinami udržuje rovnovážné tempo mezi replikujícími a zanikajícími buňkami.

Angiogenní zvrát zahrnuje změnu lokální rovnováhy mezi stimulatory a inhibitory růstu mikrocév. Nádorové buňky mohou vytvářet zvýšené množství jednoho či více stimulatorů, mobilizovat angiogenní faktory z extracelulární matrice, či stimulují k jejich produkci buňky hostitelského organismu jako např. makrofágy, či se jedná o kombinace těchto různých vlivů. (Folkman J, Holmgren L et al, Dameron KM et al,).

Mezi nejčastěji prokázané stimulatory patří bazický fibroblasty stimulující růstový faktor (bFGF) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF),ale v nádorových tkáních byla prokázána celá řada dalších faktorů (Pepper MS et al):

Stimulatory

Vascular endothelial growth factor (VEGF)
 Fibroblast growth factor (FGF)
 Angiopoietins-1 a -2(Angi-1a-2)
 Angiogenin
 Hepatocyte growth factor (HGF)
 Nitric oxide (NO)
 Interleukin-8 (IL 8)
 Platelet-derived growth factor (PDGF)

Inhibitory

Thrombospondin
 Angiostatin
 Endostatin

Placental growth factor (PLGF)

Proliferin

Endothelin

Nadprodukce angiogenních faktorů není však dostačující, musí rovněž dojít k potlačení inhibitorů, které za normálních okolností brání endotel před mitogeními stimuly. Proliferace je rovněž regulována pericyty (produkce mitogenů, či snížení citlivosti k růstovým faktorům).

Na buněčné úrovni neovaskularizace stimuluje nádorový růst díky zvýšené perfúzi a parakrinními působky, jako je produkce růstových faktorů (bFGF, IGFs, PDGF, granulocyte colony-stimulating factor) či jejich uvolněním z buněk hostitele a dopravením do nádorové tkáně.

Z klinického pohledu neovaskularizace umožňuje nádoru růst a metastazování, což často vede ke klinické symptomatologii nádorového onemocnění. Většinou nádory začínají být klinicky zřejmé až po angiogenním zvratu, ale to rovněž neznamená že to povede k rychle rostoucímu nádoru. . Někdy také vzdálené metastázy jsou potlačovány cirkulujícími inhibitory z primárního ložiska a začnou růst až po jeho odstranění.

Paradoxně, neovaskularizace snižuje schopnost průniku chemoterapeutik do nádoru. Zatímco nádory menší než 1 cm (v počátečním stádiu neovaskularizace) jsou dobře prokrveny větší nádory jsou díky útlaku cév prokrveny hůře. Útlak je způsoben zvýšeným intersticiálním tlakem při zvýšené permeabilitě nově tvořených cév a sníženým počtem lymfatické drenáže, což vede často k centrálním nekrózám. Proto také není překvapující, že antioangiogenní látky snížením intranádorového tlaku zlepšují dostupnost chemoterapie. Novotvorba cév je tedy procesem, bez kterého nemůže organismus přežít, ale je i základní podmínkou přežití a další progresu a metastazování nádorového onemocnění. Jedná se o komplexní proces řízený celou řadou faktorů a pouze jeden z biologických rysů nádorového onemocnění. (.Jaffe EA, Brooks PC et al, Rak JW et al, O'Reilly MS et al, Teicher BA et al)

Angiogeneze u nádorů štítné žlázy:

Angiogeneze hraje významnou roli u obou hlavních typů maligních nádorů štítné žlázy. U folikulárního karcinomu byla prokázána nadprodukce VEGF a má se zato, že je jedním z důvodů hematogenního metastazování. Podání protilátek blokujících VEGF vedlo ke zmenšení nádoru a metastatického potenciálu, čili o zde plní roli růstového faktoru. Naopak role VEGF u papilárního karcinomu se zdála být méně významná a to i přes průkaz jeho zvýšené produkce u nádorových buněk. VEGF zvýšením permeability cév facilituje metastazování a především VEGF-C skrze svůj VEGFR 3 receptor hraje klíčovou roli v neolymfagiogenezi, a tím i v lymfogenním šíření papilárního karcinomu. Tento fakt podporují práce prokazující jak zvýšen hodnoty VEGF u metastazujících nádorů štítné žlázy, tak zvýšenou produkci přímo v nádoru a to jak imunohistochemicky, tak analýzou mRNA.

(Mitchell C et al, Bunone G et al, Hung CJ et al, Poulaki V et al, . Hung CJ et al, Bauer AJ et al, Ye C et al., Fenton C, de la Torre NG et al, Hassan I et al, Kim DS et al, Stabenow E et al)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF je jedním z hlavních stimulatorů angiogeneze. Ve etiopatogenezi je jedním ze spouštěcích mechanismů vzniku hyperplazie štítné žlázy viz výše a rovněž hraje klíčovou roli v hematogenním šíření nádorů štítné žlázy. Jde o heparin vázající glykoproteinový homodimer, velikosti 34–42 kDa. Tento protein je vysoce účinný stimulator angiogenní, mitogenní aktivity endoteliálních buněk, zvyšuje permeabilitu cévní stěny, stimuluje aktivátor plasminogenu a inhibitor plasminogen aktivátoru v endoteliálních buňkách. VEGF je nezbytný pro normální angiogenezi embrya a ztráta tohoto genu je pro embryo letální.

Je strukturálně podobný se skupině faktorů označovaných jako rodina VEGF faktorů, tj PlGF (placentární růstový faktor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a Orf virem indukovaný faktor (VEGF-E) (Ferrara and Davis-Smyth, Erikson and Alitalo, Persico et al, Achen et al,).

Gen pro lidský VEGF je tvořen 8 exony a 7 introny. Na promotoru transkripce VEGF genu se nachází hypoxia response element (na hypoxii reagující struktura). Mezi další faktory indukující tvorbu VEGF patří některé mediátory zánětu (IL-1, IL-6, TNF- α ,) a dále hormony jako jsou steroidy, tyreotropin, kortikotropin, inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) a inzulin. (Neufeld et al, Ferrara N.).

Samotný VEGF má minimálně 5 izoform lišících se délkou aminokyselinového řetězce tj 121, 145, 165, 189, 206 AMK. VEGF₁₂₁ volný, rozpustný protein, který se neváže na heparin, VEGF₁₆₅, homodimer o velikosti 45 kDa, je dominantní izoformou, která se váže na heparin a částečně také na povrch buněk a extracelulární matrix. Zbývající varianty VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉, a VEGF₂₀₆ se v séru nevyskytují v signifikantních množstvích protože se vážou na extracelulární matrix.

VEGF vykazuje vysokou afinitu ke 2 typům tyrosin kinázových receptorů, které vážou faktory z rodiny VEGF: VEGFR-1 a VEGFR-2, ty jsou produkovány především endoteliálními buňkami. VEGFR1 je rovněž přítomen na trofoblastických buňkách a makrofázích, zatímco VEGFR2 je přítomen na hemopoetických kmenových buňkách, megakaryocytech. VEGFR3 tyrosin kinázový receptor vykazuje vysokou afinitu s VEGF-C a VEGF-D a je zodpovědný za novotvorbu lymfatických cév. (Saaristo A.).

Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF

Pro schopnost se vázat na heparin a také aktivita bFGF je modifikována heparinem, je někdy nazýván Heparin vázající růstový faktor (HBGF-2). Společně s acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) patří do celé skupiny 7 strukturálně podobných proteinů, které vykazují shodu ve 30-50% jejich aminokyselinovém řetězci. Basic FGF má molekulovou hmotnost 18 kDa, zatímco acidic FGF 16 kDa. (Kurio K. and Toi M., Baird A. and Bohlen)

Basic FGF byl izolován v celé řadě tkání včetně endotelu a plní jak auto tak parakrinní roli. Bazický FGF stimuluje proliferaci buněk mesodermálního a neuroektodermálního původu, což zahrnuje fibroblasty,

endoteliální buňky, astrocyty, oligodendrocyty, keratinocyty, osteoblasty. Je rovněž chemotaktický a mitogéní faktor pro endoteliální buňky in vitro, indukuje produkci faktorů degradujících bazální membránu a migraci endoteliálních buněk do kolagenové matrix. Tato sledování vedou k možným závěrům, že bFGF hraje svoji roli při in vivo angiogenezi, reparaci poranění, embryonální vývoj a diferenciaci. Rovněž se zdá být zřejmé, že neadekvátní produkce bFGF a ostatních faktorů této skupiny se podílí na vzniku nádorového onemocnění. (Baird and Bohlen, Fedi P J et al., Folkman J.)

I.7.1.C.Onkogeny

MET onkogen

Kóduje Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), potentní mitogen a stimulant růstu tyrocytů skrze 190 kDa receptor tyrosine kinázy (RTK). Amplifikace či nadprodukce met onkogenu je popsána přibližně v 75% papilárních karcinomů, 25% folikulárních karcinomů a minimální u benigních lézí a normální tkáni štítné žlázy. Zatím není jednoznačný vztah mezi expresí a agresivitou nádoru.

MYC onkogen

Transkripční faktor c-myc aktivuje expresi několika genů regulujících buněčný růst. Jeho syntéza je snížena v průběhu buněčného cyklu a kompletně zastavena během diferenciaci a s tím i zastavena proliferace buňky. Někteří autoři prokázali souvislost mezi abundantním myc mRNA a hůře diferencovanými nádory štítné žlázy s mnohem agresivnějším růstem. (Hall, P. Et al, Müller-Höcker, J)

RAS onkogen

Ras onkogeny zahrnují geny Ha-ras1, K-ras2, N-ras. Produkce mutantních (trvale aktivních) ras proteinů (21 kDa proteiny), které hrají klíčovou roli nádorové genezi a progresi a to nejen ve štítné žláze. Mutace ras genu vedou ke genové nestabilitě, dalším mutacím a maligní transformaci. Nadprodukce je tedy spojena jak s normální růstem, tak benigními a maligními neopláziemi. (Krohn K, et al. Basolo F, et al. Esapa CT, et al.)

BRAF

RAF protein mají podobnou signální cestu jako ras, jsou regulovány vazbou na ras proteiny BRAF je nejdůležitějším proteinem fosforylujícím MAPK family kinázy a zapojuje se do regulace apoptózy a proliferace. Původně nalezen u melanomů, později prokázán u kolorektálních nádorů a nádorů štítné žlázy. (Davies H, et al., Rajagopalan H, et al., Cohen Y, et al., Kimura ET, et al.)

RET/PTC

Nejčastější genetická abnormalita u nádorů štítné žlázy. Papilární karcinomy zahrnují ret, protoonkogen, který kóduje povrchovou RTK (receptor tyrosine kinase). Nález ret onkogenu je typický pro nádory štítné žlázy, především papilární karcinom. Jeho single mutace však způsobující u C-buněk vznik medulárního karcinomu. V současnosti se real time PCR RET/PTC onkogenu používá k diagnostice malignit u FNAB.

Kromě medulárních karcinomů se prokázala silná korelace mezi expozicí radiací vznikem RET mutace a následně indukci papilárního karcinomu. V oblastech postižených Černobylským výbuchem je nejčastější mutací RET/PTC5. Medulární karcinom vzniká ze sporadických mutací. (Pierotti MA, et al., Salassidis K, et al., Learoyd DL, et al., Nikiforov YE, et al., Mizuno T, et al., Klugbauer S, et al., Klugbauer S et al)

TRK-T

Onkogen trk (NTRK1, trkA) kóduje povrchový protein receptoru tyroxin kinázy, který váže nerve growth factor (NGF) Normálně je tento onkogen exprimován v periferních nervových gangliích: Zatím pouze pár studií prokazuje nepřítomnost v benigních lézích a přítomnost v maligních nádorech štítné žlázy. (Greco A, et al., Greco A, et al., Portella G, et al.)

I.7.1.D inhibice kontroly buněčného cyklu

Buněčný cyklus je velmi komplexní děj, který je regulován celou řadou mechanismů stimulačních i inhibujících proliferaci. Deregulace buněčné proliferace může vyústit např. v nádorové bujení. Podstatou regulace je vzájemná interakce specifických proteinů. Ve standardně probíhajícím buněčném cyklu je regulace zajištěna především zastavením cyklu v tzv. kontrolních bodech, což jsou specifické úseky v průběhu fáze G1, G2 a mitózy. Teprve poté dochází k posunutí buňky do další fáze. Hlavní G1 kontrolní bod je pod vlivem růstových faktorů (mitogenů). Buněčný cyklus je regulován následujícími faktory:

- Proteiny a geny řídicího systému buněčného cyklu

Tyto proteiny jsou reprezentovány jednak klíčovými pozitivními regulátory buněčného cyklu: cykliny a cyclin-dependentními proteinkinázami, jednak klíčovými negativními regulátory buněčného cyklu - inhibitory proteinkináz, např. p15, p16, p21, p27. U vyšších živočichů se rozlišuje 8 typů cyklínů (A-H) typických pro určité fáze buněčného cyklu. Cykliny C, D a E kontrolují vstup buňky do S-fáze, zatímco cykliny A, B regulují přechod buňky do mitózy. Cyclin-dependentní proteinkinázy (Cdk) jsou účinné ve spojení s cykliny. U vyšších obratlovců rozlišujeme 7 typů cyclin-dependentních proteinkináz. Cyklické napojování a odpojování cyklínu je hlavní děj zajišťující sekvenci pochodů buněčného cyklu.

V pozitivní a negativní regulaci buněčného cyklu zaujímají rovněž význačné postavení geny účastníci se jeho regulace - protoonkogeny a tumor supresorové geny. Protoonkogeny (proliferční geny) jsou geny, které regulují prostřednictvím jimi kodovaných proteinů normální buněčnou proliferaci. Zejména regulují transkripci genů pro cykliny a Cdk proteinkinázy. Jejich přítomnost je nutná k překonání G1 kontrolního

bodů. Produkty protoonkogenů se uplatňují jako růstové faktory nebo membránové receptory růstových faktorů či cytoplasmatické kinázy, ras proteiny (GTP vážící proteiny) a jaderné proteiny. Aktivace protoonkogenů a jejich přeměna na onkogeny se uskutečňuje bodovou mutací, translokací, delecí nebo amplifikací. Výsledkem těchto změn je zvýšená produkce genového produktu-proteinu, a tím i vystupňovaná buněčná proliferace. Tumor supresorové geny (antiproliferační geny, antionkogeny, onkosupresorové geny) jsou geny, jejichž produkty omezují aktivitu řídicího systému a podílejí se na zastavení cyklu v G1 kontrolním bodě. Kromě restrikce proliferativní aktivity ovlivňují v normálních buňkách rovněž buněčnou diferenciaci a apoptózu. Mutace těchto genů mohou významně ovlivnit buněčnou proliferaci ve smyslu jejího zvýšení, což může vést až k nádorovému bujení. Tato skupina genů má při vzniku neoplasií stěžejní význam. (Holland et al)

Cyklin D 1 je hlavním regulátorem buněčného cyklu - přechodu z G1 do S fáze. Tento přechod je realizován interakcí mezi cyklinem D1 a specifickými cyklin dependentními kinázami, které následně deaktivují pRb genový produkt. Tato inaktivace vede k přechodu z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Protein je kódován genem CCND1 na chromozómu 11q23 a jeho exprese je zvýšena u celé řady nádorů. Nadprodukce cyklinu D1 byla prokázána jako nezávislý predikátor lymfatických metastáz u papilárního karcinomu. (Basolo F, et al., Khoo ML, et al., Wang S, et al.)

Thymidinkináza (TK) katalyzuje přeměnu deoxythymidinu na deoxythymidinmonofosfát (dTMP) za přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP). TMP je převeden v několika krocích na trifosfát, který je zabudován do DNA. Protože lze do DNA zabudovat thymidin jen ve fosforylované formě, hraje thymidinkináza podstatnou roli při zpracování thymidinu v buňce. *De novo* syntéza thymidinofosfátu normálně probíhá za katalýzy thymidylátsyntetázy z deoxyuridinmonofosfátu za přítomnosti kyseliny listové a vitamínu B₁₂. Thymidinkináza na rozdíl od thymidylátsyntetázy používá jako substrát buď exogenní thymidin z potravy nebo endogenní thymidin uvolněný z odbourávacích reakcí. Je označována také jako „salvage enzyme“ (záchranný enzym). V eukaryotních buňkách se nacházejí dva isoenzymy thymidinkinázy, které se odlišují biochemicky a elektroforeticky TK 1- fetální a TK 2 – dospělá. TK1 izoenzym je asociován s dělením buněk a je lokalizován v cytoplazmě, TK2 je lokalizovaná v mitochondriích. Maximum aktivity TK1 je na přechodu G1/S fáze buněčného cyklu, zatímco aktivita TK 2 je konstantní v průběhu celého cyklu. Proto je možné požit stanovení TK 1 jako možný marker proliferativní aktivity jak v séru tak v tkáňovém extraktu. U zdravého dospělého jedince se nacházejí v séru jen nízké koncentrace TK 1, vyšší hodnoty se mohou vyskytnout u neoplastických onemocnění a některých virových infekcí. Thymidinkináza tedy není regulátorem, ale markerem intenzity proliferace jako např. imunohistochemický marker Ki-67. Thymidinkináze je věnována řada publikací z 80.-90 let 20.století především zaměřené na oblast hematologie. Její význam v monitoringu vývoje hemoblastóz je nesporný a patří mezi rutinní analýzy.

Co se týče analýzy TK v cytozolu existuje jen několik publikací věnující se danému tématu. Práce jsou věnovány nádorům prsu, jsou převážně imunohistochemické. (Addler, Mc Auslan, O'Neill et al, Robertson JFR et al., Lejčko et al, Spaní P et al, He Q et al, Gilles SI et al, Wu J et al., Broet P et al, Romain S et al).

V roce 2000 vyšlo doporučení na stanovení tymidikinázy v cytozolu, jednoznačně potvrzující nutnost užívání jiných pufrů než pro sérum. Ani tato standardizace nevedla ke zvýšení počtu nových publikací, práce jsou stále spíše výjimkou a jsou věnovány tkáňovým extraktům karcinomu prsu. Tymidinkináze se zde jeví jako slibný marker proliferční aktivity, jejíž vysoké koncentrace jsou spojeny s větší agresivitou nádoru a nepříznivou prognózou. (Spaní P et al, He Q et al, Gilles SI et al, Wu J et al, Broet P et al, Romain S et al)

I.7.2. Vyřazení přirozené inhibice (faktorů) vzniku maligních klonů:

Inhibitory proliferční aktivity za normálních okolností působí proti vzniku neoplastických klonů, jejich snížená či chybň (aberrantní inaktivní varianty) exprese vede k další progresi nádorové genese.

TGF-beta

Cytokín TGF-beta, znám jako epithelial cell growth inhibitor funguje skrze vazbu na svůj receptor typu II, který následně tvoří komplex s receptorem typu I. TGF-beta indukuje apoptózu a alteruje regulační dráhy buněčného cyklu, ve štítné žláze blokuje dráhu cAMP, a tím i růst. Exprese poškozeného TGF-beta expression byla prokázána u maligních nádorů ve srovnání s normálním epitelem. (Depoortere F, et al)

p21

Dalším inhibítoem je protein p21 CDKI (inhibitor cyklin dependentní kinázy) Zastavuje buněčný cyklus v G1 fázi, což je mediováno proteinem p53, Nádory s mutovaným p53 mají nízké hodnoty p21. (Zedenius J, et al., Ito Y, et al.)

p27

KIP1 (kinase inhibitor protein), ja znám spíše jako p27. Jde o nádory suprimující gen patřící do skupiny nukleárních proteinůCDK Inibitorů. Tyto proteiny negativně regulují cyklinovou aktivitu a kontrolují přechod G1 do S fáze. Hladiny p27 jsou u nádorů sníženy v porovnání s normálními tkáněmi. Imunohistochemické studie prokázaly silnou negativní korelaci mezi množstvím p27 a prognózou. Protein p27 je nezávislým predikátorem postižení uzlin. (Khoo ML, et al., Troncone G, et al.)

Endostatin

Patří mezi inhibitory angiogeneze, jedná se o C-terminální fragment kolagenu XVIII o molekulové hmotnosti 18 kDa . Je exprimován hepatocyty a nádorovými buňkami a inhibuje proliferaci endoteliálních buněk.. V experimentálních studiích působil synergicky s dalším vysoce účinným inhibitorem angiogeneze Angiopoetinem. Obě tyto molekuly jsou původně součástí větších proteinů a jejich tvorba je vyvolána enzymatickým odštěpením. To vede k teorii, že antiangiogenní látky jsou „uloženy“ ve velkých proteinových molekulách a jsou aktivovány při angiogenezi za účelem její kontroly. U nádorových onemocnění musí být tento mechanismus zablokovan jinak proangiogenní faktory nepřeváží udržovanou rovnováhu. Význam Endostatinu pak potvrzují práce, které ho využívají terapeuticky k blokaci angiogeneze a nádorového růstu(O'Reilly et al 1997,Boehm et al 1997)

Rb retinoblastomový gen

se nachází na dlouhém raménku chromozomu 13. K jeho expresi dochází za normálních okolností ve všech somatických buňkách, kde je negativním regulátorem buněčného cyklu. Produkt tohoto genu, Rb protein, inhibuje činnost regulačních proteinů, které jsou produkty protoonkogenů myc, fos, jun apod. Jeho mutace podmiňuje vznik retinoblastomu-nádoru oční sítnice. Mutovaný Rb gen lze prokázat v buňkách mnoha jiných nádorů. (Hong FD, et al., Ewen ME, et al., Hatakeyama M et al,Holm R, et al)

Onkosupresorový gen p53

je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17. Jeho produktem je za normálních okolností nemutovaný (divoký, angl.wild) jaderný fosfoprotein p53. Tento protein ovlivňuje expresi cílových genů, jejichž proteinové produkty p21 a Bax zastaví buněčný cyklus v G1 a S fázi a navodí reparaci poškozené DNA nebo apoptózu a inhibují CDK-cyklinové komplexy. Mutovaný gen p53 naopak dovolí poškozené buňce pokračovat v cyklu a vzniklá mutace je přenesena do dalších buněčných generací. Produktem tohoto mutovaného genu je konformovaný protein, který je stabilnější a může se akumulovat v buňce v množství detekovatelném imunohistochemicky. P53 je pravděpodobně nejfrekventovanějším abnormálním genem v buňkách lidských nádorů. Mutace p53 genu vede k progresi dediferenciace nádorů štítné žlázy a v přechod na anaplastický fenotyp.(Vogelstein B et al, Gottlieb et al, Moretti F, et al., Fagin JA, et al,Hassan I et al, Quiros RM,et al, Nasir A et al)

I.7.3. Inhibice apoptotických mechanismů spolu s expresí imortalizovaného fenotypu.

Kromě nadprodukce pro proliferčních, angiogenních faktorů a současně potlačení faktorů inhibiční, musí nádorová buňka změnit svůj genotyp tak, aby zajistil nesmrtelnost svého klonu. Zajištění imortality spolu s blokadou apoptózy zajistí nádorovým buňkám definitivní převahu nad normálními tkáněmi a imunitním systémem . Základem imortalizace nádorové buňky je schopnost zajistit nezkracování telomer na kocih

chromozómů. Jejich postupné ubývání při každém buněčném cyklu, limituje počet buněčných cyklů jednotlivé buňky. Jakmile dojde ke snížení počtu telomer na kritickou hranici, není buňka schopna znovu vstoupit do buněčného cyklu.

Blokace apoptotických mechanismů (přirozená buněčná smrt) zajistí pak nádorové buňce ochranu před induktory apoptózy (cytokininy, buňky imunitního systému, parakrinní či autokrinní působky).

Telomeráza

Telomeráze je enzym zodpovědný za udržení dostatečného počtu telomer potřebných k proliferaci. Telomeráza zajistí zpětnou syntézu telomery (krátké sekvence DNA na konci každého chromozómu). Tato aktivita je esenciální pro získání imortality. U dobře diferencovaných karcinomů štítné žlázy je telomerázová aktivita přítomna ve 100% folikulárních karcinomů a cca 67% papilárních karcinomů.

(Umbricht CB, et al., Saji M, et al., Zeiger MA, et al.).

Apoptóza

Pohled na nádorové onemocnění jako na výsledek abnormálně vystupňované proliferace by byl značně jednostranný. Porucha regulace mezi množením buněk a jejich zánikem může nastat i tehdy, jestliže se omezí jejich zánik. Blokáda přirozené (tzv. programové) smrti nádorové buňky prodlouží její životnost a může vést k postupné buněčné akumulaci a tím k progresi nádorového onemocnění. Naopak indukce této programové smrti buňky vede ke snížení četnosti nádorové populace a z klinického hlediska k regresi nádoru. Programová smrt buňky, nebo-li apoptóza je geneticky podmíněný proces. Při apoptóze dochází k expresi specifických genů (tzv. geny buněčné smrti), které aktivují endonukleázy. Endonukleázy pak za přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} štěpí DNA na četné oligonukleosomální fragmenty a působí rozpad buněčného jádra a zánik buňky. Morfologicky se apoptotický zánik buňky zcela jednoznačně odlišuje od zániku buňky nekrózou. Při apoptóze dochází ke kondenzaci jaderného chromatinu, k agregaci organel a ke svašťování buňky. Na buněčné membráně se objevují puchýřky. Z buňky se postupně uvolňují fragmenty s intaktními zbytky buněčných organel, tzv. apoptotická tělíška, jež jsou postupně fagocytována. Při nekróze dochází naopak k těžkému poškození buňky, z vnějšího prostředí (hypoxií, toxiny, tepelnými změnami apod.). Škodlivý inzult vede k dizrupci membrány a obsah buňky se uvolňuje do okolí, čímž se prostřednictvím různých mediátorů a cytokinů indukuje zánětlivá reakce.

Buňka potřebuje určitý impuls k tomu, zda bude proliferovat, či nastoupí cestu programové smrti. Za jeden z klíčových regulačních mechanismů je považován onkogen c-myc, který může indukovat jak apoptózu, tak buněčnou proliferaci. O tom, který z těchto pochodů v průběhu buněčného cyklu nastane, rozhodují tzv. inhibitory a induktory apoptózy. Látky působící selektivně stimulaci proliferace zpravidla inhibují apoptózu a naopak. Mezi inhibitory apoptózy patří různé růstové faktory, pohlavní hormony a produkty onkogenů. Nejvíce je v tomto směru prostudován účinek onkogenu bcl-2 (antiapoptotického genu). Produktem tohoto

onkogenu je protein bcl-2, jehož nadbytek inhibuje zánik buňky apoptózou a podporuje buněčnou proliferaci. K dalším mechanismům, které navozují inhibici apoptózy patří např. snížená exprese proteinu bax, nebo snížená exprese antionkogenu p 53. Protein bax vytváří s proteinem bcl-2 dimer a neutralizuje antiapoptotickou funkci bcl-2. Snížená koncentrace proteinu bax se tedy projeví výraznějším účinkem bcl-2. V inhibici apoptózy se dále uplatňuje chimerický protein bcr-abl a dále se mohou uplatňovat mutované ras-geny (Klener P).

K induktorům apoptózy patří látky působící antagonisticky proti zmíněným inhibitorům (např. účinek antiestrogenů a antiprogestinů u karcinomu prsu lze vysvětlit především indukcí apoptózy). Mohutným induktorem apoptózy je antionkogen p 53 (tumor supressor gen). P 53 účinkuje jako regulátor transkripce, indukuje zástavu tranzitu $G_1 - S$ a působí represi genu bcl-2. Naopak indukuje expresi genu bax, jehož význam byl zmíněn výše. Mutace antionkogenu p 53 vede ke ztrátě jeho funkce, ustává inhibice proliferace a z klinického hlediska znamená vznik agresivní formy nádorového onemocnění. Mezi další induktory apoptózy patří protein p 21, který je inhibitorem cyklinových kináz a působí zástavu buněčné proliferace. K dalším induktorům patří i MTS_1 (multiple tumor supressor) kódující protein p 16, který je též inhibitorem kináz, na nichž jsou závislé cyklíny, které jsou důležité pro regulaci buněčného cyklu (Klener P).

Rodina Bcl proteinů

První popsána molekula této skupiny byla Bcl-2 u l folikulárních lymfomů z B buněk. Nyní byla prokázána celá rodina proteinů, z nichž některé mají anti-apoptotický efekt (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w) a další zase pro apoptotický efekt (Bax, Bak, Bok, Bad, Blk). Podobně jako Fas/Fas-L účinkují přes interakci s kaspázovou dráhou. Zatím význam jejich exprese není zcela jasný, u anaplastických nádorů byla nalezena vyšší koncentrace Bcl-2 (Adams JM et al, Branet F, et al., Pollina L, et al.).

Fas/Fas-L

Fas ligand (Fas-L) váže jeden z rodiny homotrimerických receptorových proteinů známých jako Fas. Fas/Fas-L dráha podporuje apoptózu aktivací kaspázové dráhy (Giordano C, et al., Mitsiades N, et al. Mitsiades N.,).

Tkáňový specifický polypeptidický antigen (TPS)

Patří do skupiny cytokeratinových markerů a detekuje specificky M3 epitop cytokeratinu 18 (Correale, M. et al 1994). Cytokeratiny patří do skupiny proteinů tvořících intermediální filamenta, které jsou hlavní složkou cytoskeletonu buněk. Existuje 20 různých cytokeratinů, s molekulovou hmotností mezi 40 až 70 kilodaltony, které jsou klasifikovány podle izoeletrického bodu do dvou hlavních podskupin: acidické (typ I) a bazické (typ II) (Moll et al 1982).

Expresse jednotlivých cytokeratinů je závislá od typu tkáně a stupně diferenciaci a rychlosti růstu (Fuchs et al). Čtyři typy cytokeratinů charakterizují jednoduchý epitel, dva acidické (číslo 18 a 19) a dva bazické (číslo 7 a 8). Pomocí imunohistochemického vyšetření je lze prokázat v cytoplazmě jak nádorových buněk epiteliálního původu, tak i normálních epiteliálních buněk. Přestože jsou cytokeratiny za fyziologických podmínek nerozpustné v séru a tkáňových tekutinách, v tělesných tekutinách prokazujeme jejich, ve vodném prostředí solubilní, fragmenty vzniklé proteolýzou (Sündström, B.E. et al, 1995).

Zvýšené hodnoty cytokeratinů lze nalézt u většiny nádorových onemocnění epiteliálního původu. Rovněž tak byly publikovány práce věnované významu stanovení cytokeratinů v cytosolu, které naznačují, že detekce cytokeratinových fragmentů by mohla souviset se stupněm apoptózy a jsou tedy spíše pozitivním prognostickým markerem. (Gion et al, 1986, Gion et al 1994).

I.8. Diferenciálně diagnostická problematika

Tyreoidální nádory představují poměrně široké spektrum tumorů různé histogeneze a biologického chování. Nejfrekventovanější z nich jsou tumory vycházející z folikulárních buněk, jejichž diagnóza je založena na specifických morfoloogických, případně imunohistochemických kritériích. V případě *folikulárních neoplázií (adenomů a karcinomů)* může být diferenciální diagnóza někdy velmi obtížná, neboť odlišení folikulárního adenomu od minimálně invazivního folikulárního karcinomu dle platných hledisek WHO spočívá pouze na průkazu kapsulární a/nebo vaskulární invaze, pro jejíž posouzení existují poměrně striktní kritéria (Hedinger et al 1988, Rosai et al 1992). Z praktického hlediska je často i navzdory extenzivnímu vyšetření celého pouzdra jednoznačný průkaz invaze neuspokojivý a bývá někdy ovlivněn fixačními a jinými artefakty, případně vlivy subjektivními. Navíc existují některé varianty folikulárních tumorů (hyalinizující trabekulární adenom HTA, atypický adenom) zařazované do skupiny adenomů, jejichž biologické chování je nejisté. Proto se používá celá řada rádobu specifických markerů za účelem kvalitní diferecinonální diagnostiky.

Diagnostické markery

1. stanovení tyreoglobulinu jako markeru folikulárních buněk, jichž je produktem.
2. kalcitonin marker a produkt parafolikulárních, tzv.C-buněk – typický pro medulární karcinom
3. S100 protein u nádorů z Hürthleho buněk

galectin-3,

dipeptidyl(amino)peptidáza IV (DPPIV) k diferenciaci mezi benigními a maligními nádory

proliferační markery Ki-67 (MIB-1), topoizomeráza II α k posouzení nádorové proliferace a progresu

RET/PTC u papilárního karcinomu (Medulární karcinomy rovněž disponují postižením RET genu, v němž dochází k mutacím v různých kodonech, které jsou odpovědné za různou klinickou manifestaci. Při mutaci v germinální linii se manifestuje jako MEN2A, MEN2B nebo prostý familiární medulární thyreoidální karcinom). Somatické bodové mutace RET genu se vyskytují až v 70% případů. Nízká exprese kalcitoninu, chromograninu a bcl-2 je spojena s agresivnějším chováním medulárního karcinomu.

I.9.Cytosolové markery u tkání štítné žlázy

U nádorů a benigních lézí štítné žlázy dosud nebyla publikována data věnovaná stanovení markerů ve tkáňovém extraktu formou kvantifikace imunoanalýzou. Cytosolový tkáňový extrakt však představuje reprodukovatelnou techniku získávání buněčného extraktu ze solidních tkání s následnou kvantifikací pomocí imunoanalýzy (citlivost pmol – fmol) Studie se věnují kvantifikaci angiogenních faktorů u štítné žlázy a to většinou pomocí imunohistochemických metod na parafinových bločcích či pomocí kvantifikace mRNA sledovaných parametrů. (Sato et al 1995, Soh et al 1997, Iitaka et al 1998, Klein M. 1999, Fenton 2000).

Vyšetřování řady těchto faktorů vede v současné době ke zlepšení diagnostiky maligních onemocnění štítné žlázy, jejich přesnějším histopatologickému zařazení a zlepšuje znalosti o biologické podstatě tohoto procesu. To kromě zlepšení diferenciální Diagnostiky nám v budoucnu umožní individualizaci protinádorové terapie, dle biologické povahy nádorové tkáně.

II.Hypotéza

Cílem práce bylo ověřit praktickou možnost užití cytozolových extraktů z tkání štítné žlázy jako technologie ke kvantitativnímu zkoumání biologických vlastností štítné žlázy.

- a) angiogeneze (VEGF, bFGF, Endostatinu)... markeru malignity včetně hematogenního šíření
- b) proliferačních markerů (thymidinkináza) potenciální marker agresivity
- c) markeru apoptózy (TPS – tkáňový specifický antigen)marker degradace cytoskeletonu při apoptóze.

Zároveň jsme chtěli zhodnotit jejich potenciální význam v diferenciální diagnostice maligních a benigních uzlů štítné žlázy, jako i parciální rozdíly mezi papilárním a folikulárním karcinomem.

III. Metodika

Charakteristika souboru:

Pro imunoanalytické stanovení v cytosolu bylo užito čerstvě získaných tkání, které byla odebrány během operace, tkáň byla ihned transportována na patologii tj během 30–45 minut, kde byl oddělen o velikosti cca 1 cm³. Tento vzorek byl ihned rychle zmražen v tekutém dusíku a poté uchován při –80.0°C až do zpracování tkáně. Tento postup je nutné provést co nejrychleji, abychom zablokovali autolytické procesy probíhající v mrtvé tkáni. Celkem bylo získáno 166 vzorků (85 strum, 34 benigních adenomů a 10 nádorů). Již zde jsme narazili na několik zásadních problémů. Díky zlepšené USG diagnostice jsou operované uzly velmi malé a pokud musíme zachovat dostatečné množství tkáně pro rutinní histologickou analýzu, zbývá často minimálně tkáně k analýze cytozolu. Rovněž koncentrace většiny resekcí nádorových lézí do pražských center (především Motol), způsobila, že v souboru bylo zastoupeno minimální množství maligních nádorů a nebylo možné provést diferenciální diagnostiku. Pouze 6 případech jsme získali jak lézi tak okolní zdravou tkáň.

Příprava tkáňového extraktu (cytosolu)

Zavedení vyšetření markerů z cytosolu vzniklo z požadavku na kvantifikaci množství estrogenových a progesteronových receptorů u nádorů prsu, v době, kdy neexistovaly specifické protilátky, tedy i imunohistochemické vyšetření. Metoda byla založená na principu radioisotopové analýzy za použití aktivního uhlí a Scatchardovi analýzy a vztahení koncentrace na obsah proteinu ve vzorku. Ve stanovení analytu v cytosolu je důležitá především fáze přípravy vzorku. Tato preanalytická část zahrnuje získání nekonzervované tkáně, její urychlené zmrazení a uchování. Následně je tkáň homogenizována a buňky jsou lyzovány. Oddělení cytosolu od nerozpustných buněčných a mezibuněčných struktur pak probíhá ultracentrifugací při 100 000g. (EORTC 1973, 1980). Od té doby vznikla celá řada publikací, zhodnocující význam stanovení nádorových markerů v cytosolu (Mansour EG., et al; Gion et al). Stanovení v cytosolu se tedy stalo jednou z možností kvantifikace analytů ve tkáni. Oproti imunohistochemickému vyšetření poskytuje kvantitativní výsledek bez závislosti na hodnotící osobě, ale ztrácí se však jakákoliv informace o struktuře tkáně.

Příprava cytosolu je rozhodující v celé analýze. Při této proceduře se tkáň zhomogenizuje, následně se homogenizát rozmíchá v elučním pufru a centrifugací se získá supernatant, který se použije k analýze. Jako základ jsem vycházel z doporučení EORTC, 1973 a 1980, ke stanovení estrogenových receptorů v tkáňové extraktu nádoru prsní žlázy. Rozhodujícím na celé proceduře je volba správného pufru. Následná imunoanalytická reakce je totiž závislá na určitém pH, koncentraci proteinů a složení reakčního roztoku. Každá metoda však může vyžadovat své specifické reakční podmínky. To by znamenalo připravit pro každou jednotlivou analýzu jiný eluční pufr. To je jak nepraktické, tak rovněž neproveditelné, neboť zvláště

u nádorových lézí je získáno minimální množství materiálu, takže lze provést homogenizaci pouze jednorázově a homogenizát použít pouze v jednom elučním pufru, proto v první fázi probíhala optimalizace elučního pufru.

Všechny vzorky byly uloženy do zpracování (homogenizace) uloženy při -80°C , zpracování probíhalo v sériích minimálně po 6 homogenizátech. Limitujícím faktorem zde byla kapacita ultracentrifugy. Homogenizace probíhala na mechanickém homogenizátoru firmy Verder, 1 cm^3 tkáně se homogenizuje v mechanickém oscilačním homogenizátoru za stálého chlazení tekutým dusíkem. Homogenizace probíhá v homogenizační teflonové tubě, která obsahuje 2 wolframkarbidové kuličky. Homogenizát- jemný prášek je získán po asi 50-90 s. K získanému homogenizátu se následně přidá eluční pufr. Vzniklá směs se po vyvážení centrifuguje po dobu 60 minut při $100\ 000\times g$. Následně odsajeme supernatant. V získaném supernatantu se provede stanovení koncentrace bílkoviny a následně se naředí, tak abychom dosáhli optimálního měřitelnou koncentrací celkové bílkoviny a stanovovaných analytů. Nakonec se opět stanoví koncentrace bílkoviny ve vzorku, vzorek se rozdělí na aliquoty, které se použijí při následné imunoanalýze. Pokud není prováděno imunoanalytické stanovení ihned jsou aliquoty uloženy při -80°C až do analýzy.

Jako původní pufr bylo užito EORTC pufru o složení:

1,211 g/l TRIS base, 0,558 g EDTA (dinatrium dihydrat), 1,210 g/l Natrium Molybdenat. pomocí HCL je nastaveno pH na 7,4-7,5 při pokojové teplotě, a těsně před použitím pufru se přidává Monothioglycerin-MTG (naředěný z koncentráту v poměru 1:10 000). Tento pufr vyhovoval při většině testovaných metod, kromě stanovení VEGF a bFGF, kdy se v analýze projevil matricový efekt, tj. výsledek analýzy byl silně ovlivněn stupněm ředění. Bylo proto vyzkoušeno několik různých podvariant tohoto základního roztoku.

Jako optimální byl po konzultaci a vzájemné spolupráci s pracovištěm v Dr. Giona z Benátek, Itálie vybrán pufr o následujícím složení:

$\text{Na}_2\text{H PO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ 1.8 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$ 0.78 g/L; Dithiothreitol 0.154 g/L; K_2EDTA 0.61 g/L; Azid sodný 0.195 g/L; Glycerol 10% w/v; Molibdenan sodný 2.42 g/L

Tento pufr již nevykazoval matricový efekt u stanovení VEGF a bFGF a byl rovněž použitelný pro ostatní imunoanalytické metody.

Stanovení obsahu celkové bílkoviny v tkáňovém extraktu:

Zde původně testovali fotometrické stanovení dle Bradforda (Stoscheck Ch), ale zároveň jsem testovali i metodu na automatickém analyzátoru firmy Roche, analyzátor Hitachi 817. Bylo použito komerčně dodávaného setu na stanovení celkové bílkoviny v moči či mozkomíšním moku. Metoda byla popsána Iwata a Nishikaze 1979 a modifikována Luxton et al 1989. Základem je reakce bílkoviny s benzethonium chloridem v alkalickém prostředí a měří se vzniklá turbidita při 505 nm, která je stabilnější než u metod používajících trichloracetovou kyselinu a sulfosalicylovou kyselinu. Tato metoda vykazuje dobrou reaktivitu k proteinům, ale neinterferuje s malými peptidy. Interference s magnéziiovými ionty je eliminována přidáním EDTA. Linearita kalibrační křivky byla v oblasti 0,02 – 2 g/L.

Obě metody poskytovaly srovnatelné výsledky, ale vzhledem k možnosti automatizace stanovení byla vybrána metoda s benzethonium chloridem.

Princip imunoanalytických metod

Imunoanalýza patří mezi analytické postupy založené na reakci ligandu a vhodného vazebného reagens "ligandová analýza".

Nejobvyklejší variantou jsou imunoanalytické metody, využívající reakci mezi antigenem a specifickou protilátkou, tedy imunochemický princip. Protilátka musí být specifická tj. musí reagovat pouze s příslušným antigenem, který se s její pomocí stanovuje.

Předností imunoanalytických metod proti metodám klasické klinické chemie je jejich vysoká citlivost a přesnost a to při koncentracích stanovovaného analytu 10^{-9} až 10^{-15} mol.l⁻¹.

Za objevitele imunoanalytických metod jsou považováni R.Yalowová S. Berson, 1960 .Zavedení imunoanalytických metod znamenalo revoluci v medicínských oborech, a proto byla R Yalowová odměněna v roce 1977 Nobelovou cenou.

Typy immunoanalytických metod:

A. kompetitivní

B. nekompetitivní.

A. Při *kompetitivních metodách* je specifická protilátka (Ab), jako vazebný reagent, v reakci přítomna v nedostatku. O její vazebná místa soutěží (kompetují) vhodně značený antigen (Ag*) se stejným neznačeným antigenem (Ag), který je přítomen v analyzovaném vzorku, a dochází tak postupně k saturaci vazebných míst protilátky oběma antigeny. Kvantifikace analýzy je umožněna přítomností značeného antigenu. Průběh lze zjednodušeně popsat vztahem



Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů, neznačeného (Ag-Ab) a značeného (Ag⁺-Ab), ve kterých jsou antigeny vázány na protilátku. V reakční směsi zůstávají současně i antigeny nevázané tj.volné (Ag*, Ag). Množství vznikajícího značeného komplexu (Ag*-Ab) je nepřímě úměrné množství přítomného

neznačeného antigenu (Ag). Podíl značeného antigenu (Ag*), vázaného na protilátku (tj. množství značeného komplexu Ag*-Ab) se označuje jako vázaná frakce B (z anglické terminologie „bound“). Volná frakce značeného antigenu je označována F (z angl. „free“). Pro kvantitativní vyhodnocení je nutná separace volné frakce od vázané, která se provádí různými fyzikálně-chemickými postupy.

Podle druhu použitého indikátoru lze, po oddělení vázané (B) a volné (F) frakce, kvantifikovat průběh reakce změřením radioaktivity, absorpance, fluorescence, luminiscence apod., alespoň jedné z frakcí. Současně s vzorky se vždy stanovuje obsah sledované látky ve vzorcích o známé koncentraci (kalibrátorech). Tím lze znázornit grafickou závislost měřené odezvy (osa y) na koncentraci antigenu (osa x) a tak sestavit kalibrační závislost. Jestliže se za stejných podmínek jako kalibrátory analyzuje vzorek s neznámým obsahem antigenu, pak po skončení reakce, separaci a změření odezvy lze určit z kalibrační závislosti jeho příslušnou koncentraci.

B. Nekompetitivní metody jsou charakterizovány tím, že specifická protilátka je v reakci přítomna v nadbytku. S ní tentokrát reaguje pouze jeden antigen, který je určovanou látkou (Ag) a pro kvantifikaci slouží vhodně označená samotná specifická protilátka (Ab*). Průběh lze opět zjednodušeně popsat vztahem:



Množství komplexu (Ag-Ab*) je tentokrát přímo úměrné množství stanoveného antigenu.

Nekompetitivní imunoanalytické metody jsou často označovány jako imunometrické metody. V praxi se používá v modifikované formě tzv. "two-site" imunometrická analýza, kdy ligandem je stanovovaný antigen a do reakce vstupují v nadbytku dvě specifické protilátky jako vazebné regens. Každá z nich je namířena proti jiné antigenní determinantě stanovovaného antigenu, přičemž jen jedna je vhodným způsobem označena a slouží tak jako indikátor průběhu reakce. Schematicky je pak možno princip této metody popsat pomocí vztahu:



Neznačená protilátka bývá většinou zakotvena na stěnu reakční zkušavky nebo na jinou pevnou fázi (partikule, kuličky,...) a usnadňuje tak podstatným způsobem separační krok metody.

U nekompetitivních imunoanalýz je konstantní množství značené protilátky, proměnlivé je množství antigenu, který je určován. Množství vzniklého značeného komplexu [Ab₁-Ag-Ab₂*], je přímo úměrné množství určovaného antigenu.

Rovněž u této metody je třeba pro vyhodnocení reakce separovat vázanou frakci indikátoru, tedy komplex [Ab₁-Ag-Ab₂*] od volné (nezreagované) značené protilátky Ab₂*.

Kalibrační závislost změřené odezvy (osa y) jako funkce koncentrace stanovovaného antigenu (osa x) má v určitém rozsahu koncentrací více či méně lineární charakter. (Závada M., Topolčan O., et al, 1982, Chard, 1990, Doležalová V. et al 1995)

Typy imunoanalytických metod:

A. radioizotopové (RIA, IRMA)

B. enzymatické (EIA, ELISA, MEIA...)

C luminiscenční (LIA, ILMA)

D. Fluorescenční(FIA, FPIA, TRACE)

E. Speciální typy

A. radioizotopové (indikátorem je I_{125})..... jejich výhodou vysoká citlivost, reprodukovatelnost, relativně snadné značení a minimální prostorová interference indikátoru v reakci, nevýhodou je nutnost drahého detekčního zařízení a dodržování pravidel zacházení s radioaktivními látkami včetně odpadového hospodářství, minimální možnost automatizace, krátká expirace souprav.

B. Enzymatické metody používají jako indikátor enzym (nejčastěji křenuvou peroxidázu, alkalickou fosfatázu) a při následné reakci se substrátem vzniká produkt, který je po zastavení reakce měřen fotometricky. Mezi výhody patří jak snadnost sestavení nových metod, možnost automatizace, malé nároky na přístrojové vybavení a běžné podmínky na zacházení s odpadem, relativně dlouhá expirace..... nevýhodami pak jsou nižší citlivost a specifita (do reakce pak vstupuje i kvalita proběhlé enzymatické reakce), nutnost měření v krátkém časovém úseku po dokončení reakce s nemožností opakování po několika hodinách, větší citlivost reakce k matricovým efektům jako je hemolýza, lipémie a apod.)

C. Luminiscenční metody používají jako indikátor rozpad luminiskující molekuly, která uvolňuje světelné záření, které je detekováno. Luminiscence je spouštěna chemickou či enzymatickou reakcí. Mezi výhody patří jak vysoká citlivost, možnost automatizace a běžné podmínky na zacházení s odpadem, relativně dlouhá expirace..... nevýhodami pak jsou drahé přístrojové vybavení ,měření v extra krátkém časovém úseku, s nemožností opakování.

D Fluorescenční metody používají jako indikátor fluorescence molekul indikátoru, která je indukována ozářením laserovým paprskem. U některých metod je eliminace přirozené fluorescence zajištěna molekulami s prodlouženou fluorescencí a měřením v časovém úseku po vyhasnutí přirozené fluorescence (tzv. Time - resolved fluorescence). Jedná se o metody s nejvyšší citlivostí specifitou s možností automatizace a , relativně dlouhou expirací..... nevýhodami pak jsou drahé přístrojové vybavení, a vysoké náklady na jednotlivé měření, přesto tato technologie získala převahu v rutinní automatizované imunoanalýze v posledních letech.

E. Speciální typy

Vedle metod využívajících reakci mezi specifickou protilátkou a antigenem, existují i analogy těchto metod, založené na neimunologickém charakteru vazby ligandu a vazebného reagens. Mezi ně patří například:

- Metoda kompetitivní vazby s proteiny (CPBA), která používá jako vazebného reagentu transportní proteiny

séra, např. globulin vázající tyroxin (TBG)

- Receptorová analýza (RA) používá jako vazebného reagentu receptory, t.j. buněčné vazebné bílkoviny

- Enzymová analýza (EA), používající jako vazebného reagentu enzym

Mezi tyto metody je nutné zmínit metodu REA, která je užívána ke stanovení aktivity Tymidinkinázy..... aktivita enzymu tymidinkinázy je úměrná množství fosforylovaného specifického produktu- ^{125}I (^{125}I -iododeoxyuridine). Tato technologie umožňuje stanovení biologické aktivity enzymu, na rozdíl od stanovení kvantity enzymu (množství molekul enzymu bez znalosti biologické aktivity)

Stanovení VEGF v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy R&D Systems, USA. Jedná se o kvantitativní „sandwich“ nekompetitivní enzymoimunonalyzu. První specifická monoklonální protilátka je potažena na stěnách jamek mikrotitrační destičky, standardy a vzorky jsou napipetovány do těchto jamek a přítomný VEGF je imobilizován vazbou na první protilátku (1. inkubace 2 h při pokojové teplotě bez třepání). Po promytí nenavázaných substancí se přidá druhá protilátka s navázaným enzymem (křenovou peroxidázou), která je rovněž specifická pro VEGF(2. inkubace 2 h při pokojové teplotě bez třepání). Po dalším promytí se přidá substrát, který enzymatickou reakcí mění své zabarvení a to úměrně množství přítomného enzymu (3. inkubace 20min ve tmě, při pokojové teplotě bez třepání). Reakce je po určité době zastavena a intenzita barevného zabarvení je měřena na fotometru 450 nm. Standardem je rekombinantní lidský VEGF₁₆₅. Kalkulace výsledků byla provedena pomocí software, proložení křivky bylo provedeno pomocí 4 parametrové logistické analýzy (4-PL). Specifita – metoda nevykazuje zkříženou reakci s asociovanými látkami jako jsou, s FGF faktory, PDGF, IL 1 – 13, Angiogenin.

Stanovení bFGF v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy R&D Systems, USA. Jedná se o kvantitativní „sandwich“ nekompetitivní enzymoimunonalyzu. První specifická monoklonální protilátka je potažena na stěnách jamek mikrotitrační destičky, standardy a vzorky jsou napipetovány do těchto jamek a přítomný bFGF je imobilizován vazbou na první protilátku (1. inkubace 2 h při pokojové teplotě bez třepání). Po promytí nenavázaných substancí se přidá druhá protilátka s navázaným enzymem (křenovou peroxidázou), která je rovněž specifická pro VEGF(2. inkubace 2 h při pokojové teplotě bez třepání). Po dalším promytí se přidá substrát, který enzymatickou reakcí mění své zabarvení a to úměrně množství přítomného enzymu (3. inkubace 30min ve tmě, při pokojové teplotě bez třepání). Reakce je po určité době zastavena a intenzita barevného zabarvení je měřena na fotometru 450 nm. Standardem je rekombinantní lidský basic FGF. Kalkulace výsledků byla provedena pomocí software, proložení křivky bylo provedeno pomocí vážené lineární regrese v log log zobrazení, čímž bylo dosaženo optimální linearizace kalibrační

křivky. Specificita – metoda nevykazuje zkříženou reakci s asociovanými látkami jako jsou, s VEGF faktory, PDGF, IL 1 – 13, Angiogenin, ale vykazuje 100% cross reaktivitu s hovězím basic FGF.

Stanovení Endostatínu v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy Chemicon International, USA. Jedná se o kvantitativní kompetitivní enzymoimunonalyzu. Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy na stěnách kozí anti králičí protilátkou, standardy, vzorky, endostatin s navázaným biotinem a králičí protilátka proti Endostatinu jsou napipetovány do těchto jamek. Během inkubace (1. inkubace 3 h při pokojové teplotě bez třepání) dojde ke kompetici Endostatinu obsaženém ve vzorku či standardu s Endostatinem s biotinem o limitované množství polyklonální králičí protilátky. Vytvořené komplexy jsou pak vycytány antikráličí kozí protilátkou na stěně jamek. Po promytí nenavázaných substancí se přidá streptavidinem značená alkalická fosfatáza a proběhne další inkubace (2. inkubace 30min při pokojové teplotě bez třepání) druhá protilátka s navázaným enzymem (křenovou peroxidázou), která je rovněž specifická pro VEGF. Po dalším promytí se přidá substrát, který enzymatickou reakcí mění své zabarvení a to nepřímo úměrně koncentraci Endostatinu ve standardu či ve vzorku (3. inkubace 20min ve tmě, při pokojové teplotě bez třepání). Reakce je po určité době zastavena a intezita barevného zabarvení je měřena na fotometru 490 nm. Kalkulace výsledků byla provedena pomocí software, proložení křivky bylo provedeno pomocí 4 parametrové logistické analýzy (4-PL). Specificita – metoda nevykazuje zkříženou reakci s asociovanými látkami jako jsou, s cytokíny, růstové faktory, , mouse Endostatin, Angiogenin.

Stanovení Thymidinkinázy v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy AB Sangtec Medical , Švédsko. Jedná se o kvantitativní radioenzymoimunoanalýzu. Ke stanovení v cytosolu byl použit TK cytosol kit, který standardizuje stanovení cytozolu (Spaní P et al) Standardy a vzorky jsou inkubovány se substrátem pro tymidinkinázu, který je značen ^{125}I (^{125}I -iododeoxyuridine). Při následné 4 hodinové inkubaci při teplotě 37°C tymidinkináza fosforyluje přidaný substrát. Pak je reakce zastavena a fosforylovaný produkt je separován pomocí separačních tablet. Po té je celá směs 4x promyta. Následně se měří radioaktivita fosforylovaného produktu na gamaměřiči, která je přímo úměrná aktivitě tymidinkinázy. Kalkulace výsledků byla provedena pomocí software, proložení křivky bylo provedeno pomocí spline analýzy.

Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS) v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané soupravy od IBL, Švédsko. Jedná se o kvantitativní nekompetitivní radioimunoanalýzu. Zkumavky jsou potaženy monoklonální protilátkou proti M3 epitopu cytokeratinu 18. Standardy a vzorky jsou inkubovány s 2. monoklonální protilátkou po dobu 2 hodin. Po té je oddělena vázaná frakce od volné promytím. Následně se měří radioaktivita gamaměřiči, která je přímo úměrná

koncentraci TPS. Kalkulace výsledků byla provedena pomocí software, proložení křivky bylo provedeno pomocí spline analýzy.

Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena s užitím statistického software S.A.S. (Statistical Analysis Software), release 8.02. Pro měřené parametry v celém souboru a v podskupinách byly počítány základní deskriptivní statistické údaje jako jsou průměr, směrodatná odchylka, medián, minimum, maximum. Dále byly počítány senzitivity, specificity, PV+, PV-, relativní riziko a diagnostická přesnost, referenční meze (cut off) byly většinou voleny tak, aby specificita byla 90 % (nebo 95 %), nebo byla použita v literatuře doporučovaná referenční mez. Na porovnání distribucí parametru v různých skupinách byly použity především neparametrické testy (protože rozložení výsledků byla většinou negaussovská) a to Wilcoxonův test a mediánový test, pro předběžné odhady byl použit též test ANOVA (jehož závěry vesměs souhlasily se závěry Wilcoxonova a mediánového testu). Byly použity jak více-výběrové varianty těchto testů na zjištění skutečnosti, zda vůbec existuje nějaká diference mezi skupinami v rozložení zkoumaného parametru, dále byly pak používány dvou-výběrové varianty testů. Na určení optimálních regresorů byla užitá metoda logistické regrese s krokovým (stepwise) výběrem optimálních regresorů. Byly zkoumány různé varianty - tedy nádorová skupina byla buď jen maligní nádory, nebo benigní nádory, nebo sjednocení obou. Též do logistické regrese jako potenciální regresory vstupovaly buď výsledky imunohistochemických a cytozologických vyšetření a nebo jen výsledky cytozologických vyšetření. Protože ne u všech pacientů bylo z technických příčin provedeno jak vyšetření imunohistochemické tak analýza cytozolu, zmenší se rozsah souboru při uvažování obou skupin regresorů na téměř třetinu.

Senzitivita = pravděpodobnost zvýšení parametru (koncentrace \geq cut off) za předpokladu malignity.

Senzitivita (SN) = Pravděpodobnost (koncentrace \geq cut off | malignita)

Na řádku výše svíslá čára „|“ značí „za podmínky“.

Slovní vyjádření pojmu senzitivita - kolik procent případů s maligním má zvýšené koncentrace parametru.

Specificita = pravděpodobnost normální koncentrace (koncentrace $<$ cut off) za předpokladu benigního onemocnění nebo žádného onemocnění

Specificita (SP) = Pravděpodobnost (koncentrace $<$ cut off | zdravý + benigní)

Slovní vyjádření pojmu specificita - kolik procent případů zdravých osob a benigních onemocnění má normální koncentrace parametru.

PV+ (pozitivní prediktivní hodnota) = pravděpodobnost malignity při zvýšené koncentraci parametru.

PV+ = Pravděpodobnost (malignita | koncentrace \geq cut off)

Slovní vyjádření pojmu pozitivní prediktivní hodnota - kolik procent případů se zvýšenou koncentrací parametru má maligní onemocnění.

PV- (negativní prediktivní hodnota) = pravděpodobnost benigního onemocnění + zdravé osoby při normální koncentraci parametru

(t.j. kolik procent z nízkých hodnot je u benigních onemocnění a zdravých osob)

PV - = Pravděpodobnost (zdravý + benigní | koncentrace < cut off)

Slovní vyjádření pojmu negativní prediktivní hodnota - kolik procent případů s normální koncentrací parametru je bez malignity.

RelRisk (relativní riziko = relative risk v anglické terminologii) = poměr pravděpodobností malignity při zvýšení parametru a pravděpodobnosti malignity při normální koncentraci parametru

RelRisk = Pravděpodobnost (malignita | koncentrace >= cut off) /

Pravděpodobnost (malignita | koncentrace < cut off)

Slovní vyjádření pojmu relativní riziko - kolikrát se zvýší riziko maligního onemocnění zvýšením parametru nad cut off oproti riziku malignity při normální koncentraci parametru.

Diagnostická přesnost (accuracy v anglické terminologii) = pravděpodobnost souhlasu testu s klinickým nálezem (tj. pozitivita testu u malignity a negativní výsledek testu u benigních onemocnění a zdravých osob)

Accuracy = Pravděpodobnost (malignita AND koncentrace >= cut off) +

Pravděpodobnost (zdravý + benigní AND koncentrace < cut off)

Slovní vyjádření pojmu diagnostická přesnost - v jakém procentu z celkového rozsahu dat souhlasí závěr testu s klinickým nálezem.

LR+ (T+) věrohodnostní poměr pozitivního testu = poměr pravděpodobnosti pozitivního výsledku testu při maligním onemocnění a pravděpodobnosti pozitivního výsledku testu za předpokladu benigního onemocnění + žádného onemocnění

LR+ (T+) = Pravděpodobnost (koncentrace >= cut off | malignita) /

Pravděpodobnost (koncentrace >= cut off | zdravý + benigní)

Slovní vyjádření pojmu věrohodnostní poměr pozitivního testu - kolikrát je vyšší pravděpodobnost zvýšení parametru nad cut off při maligním onemocnění oproti pravděpodobnosti zvýšením parametru nad cut off bez malignity.

LR- (T-) věrohodnostní poměr negativního testu = poměr pravděpodobnosti negativního výsledku testu testu za předpokladu benigního onemocnění + žádného onemocnění a pravděpodobnosti negativního výsledku testu za předpokladu maligního onemocnění

$$\text{LR- (T-)} = \frac{\text{Pravděpodobnost (koncentrace} < \text{ cut off | zdravý + benigní)}}{\text{Pravděpodobnost (koncentrace} < \text{ cut off | malignita)}}$$

Slovní vyjádření pojmu věrohodnostní poměr negativního testu - kolikrát je vyšší pravděpodobnost koncentrace parametru pod cut off bez malignity oproti pravděpodobnost koncentrace parametru pod cut off při maligním onemocnění.

IV. Výsledky a diskuse

Již samotná metodika přípravy cytosolu byla jedním z limitujících faktorů získaných výsledků.

1. Rozhodující roli je nutnost získat min 1cm³ tkáně k přípravě cytosolu . Odebrané tkáně však musí být v první řadě dostatek na běžná rutinní patologická vyšetření. Malé léze, tedy prakticky nelze získat, vzorky jsou získány převážně z větších benigních a nádorových lézí. Tomu odpovídá i histologická skladba získaných vzorků, kde převažují strumy a benigní adenomy (Tab.1).
2. Získaný vzorek může mít zcela jiné vlastnosti než histologem popisovaný (heterogenita vzorku). Výběr vzorku ovlivňuje patolog, který morfologicky vyšetřuje nádor a je rozhodujícím při odběru vzorku pro další zpracování. Je třeba také zmínit, že tento postup neumožňuje následné zhodnocení struktury nádoru, zastoupení normální tkáně, nekróz, stromatu a vlastního nádoru, ale je kvantitativní analýzou průměrné hodnoty sledovaného analytu v tkáňovém vzorku. Je jasné, že čím je odebraná tkáň více homogenní, tím lépe je možné usuzovat na možnou kvantitativní expresi analytu. Částečnou korekcí tohoto problému je vyjadřování získaných hodnot vůči koncentraci proteinu v získaném extraktu (EORTC 1980). To však vyvolává další možné úskalí, neboť je nutné mít dostatečně specifickou, citlivou a přesnou metodiku na stanovení proteinu. Pro různé analyty stanovované z extraktu jsou vhodné různé koncentrace proteinu, většinou v závislosti na koncentracích analytu v extraktu.
3. Centralizace léčby nádorů štítné žlázy především do pražských center vedla k tomu, že většina získaných tkání byla benigních, neboť maligní nádory resekované na našich pracovištích byly velice často do 1-2 cm a zjištěné až perioperačně.

V našem souboru jsme získávali supernatant o průměrné koncentraci proteinu 15-25 g/l. při této koncentraci lze provádět stanovení proteinu klasickou biuretovou metodou pouze orientačně, neboť se výsledky pohybují na dolní části kalibrační křivky, kde je přesnost stanovení s CV 20% a citlivější metodiky nemají v této oblasti lineární kalibraci. Většina těchto metodik je použitelné v koncentračním rozsahu 0,01- 5 g/l bílkoviny. (Stoscheck Ch. 1990). To nás vedlo k ředění získaného supernatantu na koncentrace mezi 0,01 –5 g/l s následným přesným stanovením koncentrace proteinu pomocí benzethonium chloridu v alkalickém prostředí . Ředění se provádělo pufrům užívaným při tkáňové extrakci.

Celkem bylo získáno 166 tkáňových vzorků (Tab.1) z nichž pro následnou homogenizaci s extrakcí bylo použitelných 150 vzorků, u 16 tkáňových vzorků, bylo odebráno příliš malé množství tkáně, aby bylo možno provést homogenizaci. Pro další statistické zhodnocení pak byly vytvořeny menší podskupiny ze sledovaného souboru a to (Tab.1):

1. Strumy (S)
2. Tyroiditidy (T)
3. Benigní nádory (BN)

4. Maligní nádory (MM)
5. Ostatní

U těchto vzorků bylo provedeno stanovení VEGF, bFGF, TPS, TK a Endostatinu a základní výsledky vztažené na protein jsou sumarizovány v tabulce č. 2. Tato základní tabulka poskytuje základní orientaci o hodnotách sledovaných parametrů ve vyšetřovaném souboru. Jak vyplývá z Tab č.2 při stanovení TPS bylo dosaženo vysokých koncentrací a proto ve většině případů bylo nutno vzorky ještě dále ředit a to v poměru 1:500. Linearita ředění se pohybovala v pásmu 85–115% očekávaných hodnot a tedy nebyla prokázána závislost na ředění. Konečné výsledky se pohybovaly ve střední části kalibrační křivky, tj mezi 2.a 4. standardem. Rovněž u ostatních metod byla testována závislost na ředění a získané výsledky se pohybovali v rozsahu 80-120% očekávaných hodnot, tedy rovněž nebyla zjištěna závislost na ředění.

Ve sledovaném souboru jsme hodnotili možné korelace mezi jednotlivými parametry, prováděno Spearmanovým pořadovým testem. Výsledky jsou shrnuty do tabulky č.3. Protože u části vzorků bylo provedeno rovněž imunohistochemické vyšetření vzorku na MIB-1 a CD-31 bylo možné provést korelaci mezi imunohistochemickými a cytosolovými parametry. Ve sledovaném souboru jsem našli pouze slabou korelaci mezi markeru CD-31 a tymidinkinázou, jinak spolu cytosolové a imunohistochemické parametry nekorelují. Tento fakt si vysvětlujeme především rozdílným metodickým postupem, rovněž tak imunohistochemie popisuje především strukturální změny a jejich kvantifikace je prováděna semikvantitativně, naopak imunooanalytické stanovení v cytosolu je kvantitativní stanovení průměru bez ohledu na strukturu. U MID –1 je nutno také poukázat na fakt, že nádory štítné žlázy jsou pomalu rostoucí nádory s nízkou proliferační aktivitou, tj maximální hodnoty MIB –1 indexu byly 5,5 % z vyšetřovaných buněk. Tymidinkináza je také proliferačním markerem s maximální aktivitou G1/S fázi. Hodnoty TK v cytosolu zobrazují průměrnou proliferační aktivitu celého vzorku a je tedy otázkou jak velké procento stanovené aktivity tvoří tymidinkináza z MIB-1 pozitivních buněk. V současnosti nejsou známe práce o stanovení tymidikinázy v cytozolu buněk u tkání štítné žlázy, je několik publikací zabývajících se významem TK u karcinomů prsu a kolorekta (většinou imunohistochemické či stanovení obsahu mRNA(He Q et al, Gilles SI et al, Wu J et al). Tyto práce potvrzují vztah mezi hodnotami TK a jeho proliferační aktivitou. Výjimku tvoří práce (Broet S et al a Romain SM et al), kde autoři rovněž užívali radioenzymatické analýzy cytosolu ke stanovení aktivity TK a potvrzují její význam jako indexoru proliferační aktivity u nádorů prsu.

. Cytosolové parametry vykazují středně silnou vzájemnou korelaci, která statisticky vysoce signifikantní, dle očekávání spolu silně korelují proangiogenní faktory bFGF a VEGF, které se stejnou silou korelují i Endostatinem, tj angiostatickým faktorem. Toto zjištění si je ve shodě s Gaiso M, 1999, Vycházíme-li

z frekvence histologických typů ve sledovaném souboru, pak Fakt, že je zvýšen jak pozitivní, tak i negativní marker angiogeneze u nezhoubných lézí není překvapující. Jde o fyziologický mechanismus udržování rovnováhy mezi pro a proti angiogenními působky. Tato vazba je pak narušena u maligních nádorů, což se však vzhledem k nízkému počtu maligních lézí nedalo statisticky vyhodnotit. Nejnížší zjištěné vzájemné korelace byly u faktoru VEGF, což je nejspíše ovlivněno skutečností, že stanovovaný VEGF₁₆₅ je významně navázán na trombocyty a při jejich aktivaci se z nich uvolňuje. To znamená, že hodnoty VEGF v cytosolu jsou ovlivněny množstvím přítomné krve ve vzorku. (Dittati et al 2001). V séru je tak možná standardizace pomocí speciálních odběrů stabilizující trombocyty v plné krvi (zkumavky s přídavkem CDTA). Tato stabilizace však není na tkáňové úrovni možná.

Tymidinkináza nejsilněji koreluje s TPS, což by naznačovalo možnou souvislost TPS a proliferační aktivity a to ve shodě s Kaušitz J, 1991, rovněž tak se může jednat o zvýšenou apoptotickou aktivitu v uvedených lézích, neboť většina byla benigního původu, kde je zachována relace mezi stupněm proliferace a apoptózy. V sledovaném souboru byla také prokázána významná korelace mezi proliferačními markery a angiogenetickými faktory. Tento nálezn odpovídá faktu, že zvýšená proliferační aktivita u štítné žlázy je doprovázena i zvýšeným prokrvením dané tkáně.

Následně jsme provedli zhodnocení jednotlivých parametrů dle histologických skupin (strumy, tyroiditidy, benigní a maligní nádory). Základní charakteristiky sledovaných souborů jsou shrnuty v tabulkách č. 4, 5, 6 a 7. V tab. č. 8 jsou pak sumarizovány statisticky významné rozdíly v distribucích hodnot sledovaných markerů mezi jednotlivými skupinami. Nevýznamnější rozdíly byly zjištěny mezi strumami a benigními nádory, a to prakticky ve všech parametrech, kromě VEGF a hraničně u bFGF. Mezi strumami a maligními nádory byl zjištěn rozdíl pouze u TPS; mezi strumami a tyroiditidami se lišily TPS, TK a hraničně bFGF. Mezi skupinou benigních a maligních nádorů nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl. Nevýznamné rozdíly u VEGF jsou způsobeny vysokou variabilitou dat v jednotlivých skupinách na čemž se nejspíše podílí již zmíněný fakt, tj. prokrvácení tkáně. Obecně však lze říci, že nejvyšších hodnot bylo dosaženo u benigních nádorů, a ne u maligních. Tento fakt je způsoben, jak si vysvětlujeme, zastoupením především papilárních karcinomů, tj s nádorů s nízkým proliferačním indexem a novotvorbou cév. V těchto jednotlivých histologických skupinách jsme rovněž provedli vzájemnou korelaci analytů Spearmanovým pořadovým korelačním testem (Tab. č. 9,10,11). Ve všech případech došlo k oslabení či vymizení signifikance korelačních koeficientů oproti tabulce č.3. Pouze u skupiny tyroiditid došlo ke zvýšení jak korelačního koeficientu (r), tak signifikance mezi VEGF a TK. Tyto rozdíly jsou především způsobeny sníženým počtem pozorování v jednotlivých skupinách, proto také nebyla prováděna korelace u maligních nádorů. Nízké počty a závislost na prokrvení tkáně vzorků nádorů a adenomů oproti skupinám tyroiditid a koloidní strumy jsou nejpravděpodobnějším vysvětlením vysvětlením, proč nebyly

nalezeny významné změny v produkci angiogenních faktorů jako v pracích (de la Torre NG et al, Viera JM et al, Hung CJ et al

Mezi skupinou strum a benigních nádorů byla zhodnocena diskriminační schopnost jednotlivých nádorových markerů. Jako normální skupina byly použity strumy a pro benigní nádory byly vypočteny parametry: senzitivita (SN), pozitivní prediktivní hodnota (PV+), negativní prediktivní hodnota (PV-), relativní riziko (RR) a správnost . Jako marker s nejlepšími diskriminačními schopnostmi byl vyhodnocen TPS se senzitivitou 61%(Tab. č.12).

Jako poslední tabulku č. 13 uvádíme výsledky 6 kazuistiky, kdy se podařil odběr jak normální tkáně tak uzlu. Ve všech případech byly markery signifikantně vyšší u uzlu než v okolní tkáni. Z této tabulky vyplývá jak rozhodující pro konečné výsledky je volba vzorku. Rovněž tak poukazuje na rozdíly intraindividuální mezi lézí a zdravou tkání, které mohou být významnější než srovnání jednotlivých skupin, kde jsou rovněž významné interindividuální rozdíly. Tyto rozdíly jsou však v souladu s publikovanými pracemi Fenton C, Francis G. et al ; Shushanov S et al. a můžeme předpokládat, že rozdíly mezi jednotlivými histologickými skupinami jsou ve skutečnosti větší než jsme našli.

V. Závěry:

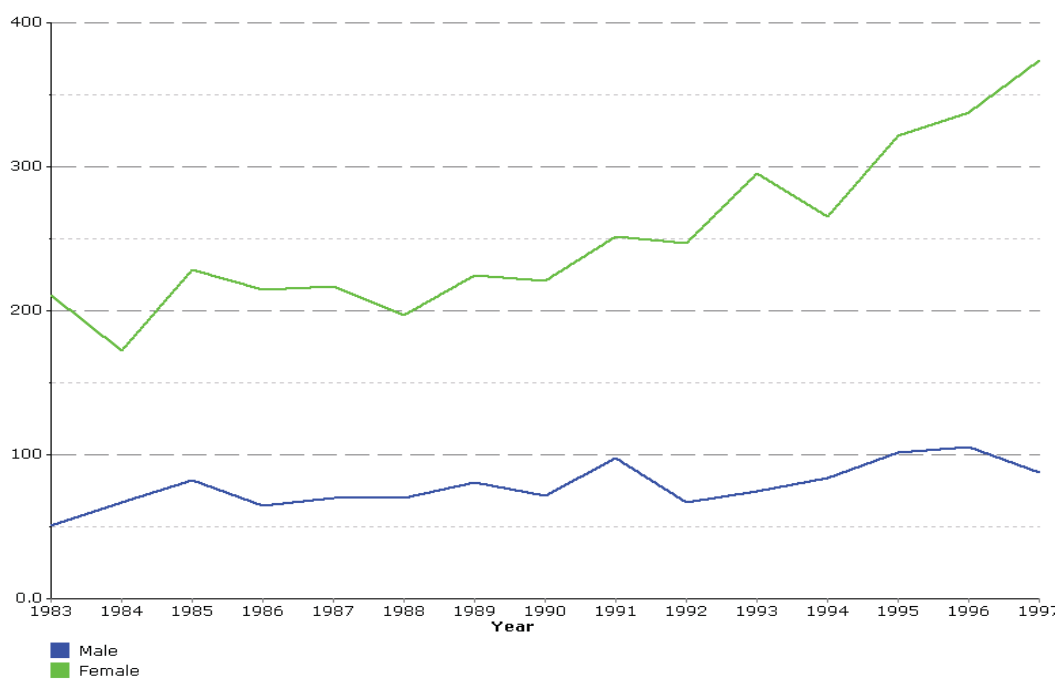
1. Byl vypracován a ověřen metodický postup odběru vzorků, uchování a extrakce cytosolu u vzorků tkáně štítné žlázy.
2. Odběr vzorku je jedním z hlavních úskalí celého postupu, nelze získat léze menší než 1cm³, variabilita je ovlivněna nehomogenitou vzorku.
3. Existují významné interindividuální rozdíly mezi sledovanými parametry v jednotlivých skupinách, což významně snižuje výtěžnost kvantitativního stanovení
4. Jako optimální se jeví kromě tkáně léze získat i část zdravé tkáně jako individuální referenční normál
5. Je nezbytná optimalizace elučního pufru a metodik vhodných pro analýzu tkáňových faktorů jako nezbytný předpokladem reprodukovatelné kvantitativní analýzy cytosolu.
6. Byly prokázány statisticky významné rozdíly v hodnotách proliferačních faktorů tymidinkinázy a TPS mezi jednotlivými histologickými skupinami.
7. Mezi proliferačními faktory existuje významná korelace, nedosahuje však takové síly, aby bylo možno hovořit o stejné diagnostické výpovědní hodnotě.
8. Byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými histologickými skupinami jak u pro-angiogenních (VEGF, bFGF), tak anti-angiogenních markerů (Endostatin).
9. U proangiogenních faktorů byly zjištěny středně významné korelace, rovněž nedosahující úrovně umožňující záměnu makrerů.
10. Byla nalezena významná pozitivní korelace mezi pro-angiogenními faktory a antiangiogenním markerem Endostatinem, jako známka dosud neporušené zpětně vazebné regulace obou procesů.
11. Cytosolové markery nedosahují dostatečně významných rozdílů, aby je bylo možno použít k diferenciální diagnostice mezi strumami a benigními lézemi.
12. Nebyla prokázána signifikantní vazba mezi imunohistochemickými markery angiogeneze či proliferace a markery cytosolovými.

VI. Závěry pro praxi:

- 1. Odběr čerstvé tkáně a extrakce cytosolu je možným postupem ke kvantifikaci vybraných parametrů tkáňových extraktů. Je však třeba si být vědom limitací celého postupu, především možné ovlivnění nehomogenitou vzorku a zprůměrováním hodnot na celý vyšetřovaný vzorek. Metoda není schopna odhalit výkyvy v aktivitě či expresi jednotlivých analytů v jednotlivých fokusech odebraného vzorku.**
- 2. Odběr, uchování a zpracování tkáně pro stanovení cytosolových parametrů je příliš složitý postup pro rutinní analýzu, kterou zůstává klasické histologické či imunohistochemické vyšetření.**
- 3. Stanovení cytosolových markerů poskytuje přídatnou informaci o průměrné kvantitě sledovaných analytů ve tkáňových vzorcích.**
- 4. Není korelace mezi imunohiostochemií a stanovením v cytosolu, což je způsobeno jak rozdílným přístupem zpracování vzorků, užíváním odlišných parametrů, ale i různým způsobem vyhodnocení analýzy.**

VII. Tabulky a grafy

Graf č.1: Trend v počtu nových případů v ČR 1983-1997 dle IARC



Tab. č. 1: Přehled histologických typů získaných tkáňových vzorků

Diagnóza	N	%
Difúzní parenchymatózní struma (DPS)	8	4,8
Koloidní struma (KS)	85	51,2
Hashimotova tyroiditis (HT)	12	7,2
Folikulární adenom (FA)	31	18,7
Onkocytární adenom (OA)	8	4,8
Konvenční papilokarcinom (PC)	11	6,6
Folikulární karcinom (FC)	2	1,3
Ostatní	9	5,4
Celkem	166	100%

Strumy (S) = DPS a KS,
Tyroiditidy (T) = HT
Benigní nádory (BN) = FA, OA
Maligní nádory (MN) = FC, PC,
Ostatní

Tab. č. 2: Základní výsledky sledovaného souboru

Metoda	Jednotky	N	průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
VEGF	ng/g proteinu	143	930,2	3128	305	1	36400
TPS	U/g proteinu	135	191462	228679	108716	1	1363934
TK	U/g proteinu	149	61,2	197,21	17	1	1600
Endostatin	μg/g proteinu	132	4,92	19,65	1,5	0,2	220
bFGF	ng/g proteinu	150	712,5	654,5	350	27	1600

Tab. č. 3: Spearmanovy pořadové korelace celého souboru srovnání s imunohistochemickým vyšetřením MIB-1 a CD 31

VEGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	MIB 1	cd_31mean
r =		0,4354	0,3181	0,2273	0,3408	ns	ns
p value		<,0001	0,009	0,017	0,0021		
n		78	105	110	79		
bFGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	MIB 1	cd_31mean
r =	0,4354		0,4582	0,4999	0,4173	ns	ns
p value	<,0001		<,0001	<,0001	0,001		
n	143		87	100	59		
TPS	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	MIB 1	cd_31mean
r =	0,3181	0,4582		0,5701	0,4194	ns	ns
p value	0,009	<,0001		<,0001	<,0001		
n	105	87		133	94		
TK	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	MIB 1	cd_31mean
r =	0,2273	0,4999	0,5701		0,4189	ns	0,3531
p value	0,017	<,0001	<,0001		<,0001		0,0066
n	110	100	133		95		58
Endostatin	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	MIB 1	cd_31mean
r =	0,3408	0,4173	0,4194	0,4189		ns	ns
p value	0,0021	0,001	<,0001	<,0001			
n	79	59	94	95			

Tab.č. 4: Základní charakteristika parametrů u skupiny S (strumy)

Metoda	Jednotky	N	průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
VEGF	ng/g proteinu	86	352,1	876,77	150	28	7077
TPS	U/g proteinu	79	126120	132978	97029	8952	718831
TK	U/g proteinu	87	24,0	42,60	14	1	345
Endostatin	μg/g proteinu	80	3,3	4,89	1,6	0,4	25,5
bFGF	ng/g proteinu	88	225,4	164,68	185	27	724

Tab.č. 5: Základní charakteristika parametrů u skupiny T (tyroiditidy)

Metoda	Jednotky	N	průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
VEGF	ng/g proteinu	10	515,3	505,93	421	48	1393
TPS	U/g proteinu	10	205755	133511	145154	70083	425789
TK	U/g proteinu	11	33,2	18,42	25	12	61
Endostatin	μg/g proteinu	8	3,9	2,84	3,85	0,8	9,4
bFGF	ng/g proteinu	4	536,8	372,94	545,5	126	930

Tab.č. 6: Základní charakteristika parametrů u skupiny BN (benigní nádory)

Metoda	Jednotky	N	průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
VEGF	ng/g proteinu	31	566,5	1103,02	126	1	5203
TPS	U/g proteinu	31	326004	309246	279808	1517	1363934
TK	U/g proteinu	34	86,7	144,65	29	2	633
Endostatin	μg/g proteinu	29	7,2	8,98	3,9	0,8	34
bFGF	ng/g proteinu	34	306,0	188,75	293	64	795

Tab.č. 7: Základní charakteristika parametrů u skupiny MN (maligní nádory)

Metoda	Jednotky	N	průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
VEGF	ng/g proteinu	5	339,6	163,3	411	134	524
TPS	U/g proteinu	8	245991	251104	130161	33589	657563
TK	U/g proteinu	10	46,3	74,46	18	4	248
Endostatin	μg/g proteinu	4	2,4	1,51	2,3	0,6	4,2
bFGF	ng/g proteinu	5	245,8	181,4	235	62	480

Tab.č. 8: Diference v distribucích hodnot jednotlivých parametrů mezi jednotlivými skupinami

	ANOVA t.	Wilcoxonův t.	Mediánový t.
S vs BN	p<	p<	p<
VEGF	ns	Ns	ns
TPS	<,0001	0,0002	0,0016
TK	0,0004	<,0001	<,0001
Endostatin	0,0139	0,0025	0,0213
bFGF	0,0643	0,0644	0,07
S vs MN			
VEGF	ns	Ns	ns
TPS	0,03	0,094	0,0246
TK	ns	Ns	ns
Endostatin	ns	Ns	ns
bFGF	ns	Ns	ns
S vs T			
VEGF	ns	Ns	ns
TPS	0,078	0,031	ns
TK	ns	0,0038	0,0233
Endostatin	ns	Ns	ns
bFGF	0,0013	0,0642	0,3062

S..... strumy; BN benigní nádory; MN.....maligní nádory; T....tyroiditidy

Tab. č. 9: Spearmanovy pořadové korelace u strum a srovnání s imunohistochemickým vyšetřením MIB-1 a CD 31

VEGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =		0,41183	ns	ns	ns	ns	ns
p value		<,0001					
n		86					
bFGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =	0,41183		ns	0,30085	ns	ns	ns
p value	<,0001			0,0046			
n	86			87			
TPS	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =	ns	ns		0,54779	ns	ns	ns
p value				<,0001			
n				79			
TK	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =	ns	0,30085	0,54779		ns	ns	ns
p value		0,0046	<,0001				
n		87	79				
Endostatin	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =	ns	0,20185	ns	0,20185		ns	ns
p value		0,0726		0,0726			
n		80		80			

Tab. č. 10: Spearmanovy pořadové korelace cytosolových markerů u tyroiditid

VEGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =		ns	ns	0,87879	ns
p value				0,0008	
n				10	
bFGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =	Ns		ns	ns	ns
p value					
n					
TPS	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =	Ns	ns		ns	ns
p value					
n					
TK	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =	0,87879	ns	ns		ns
p value	0,0008				
n	10				
Endostatin	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =	ns	ns	ns	ns	
p value					
n					

Tab. č. 11: Spearmanovy pořadové korelace cytosolových markerů u benigních nádorů

VEGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =			0,38101		
p value		ns	0,0345	ns	ns
n			31		
bFGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =			0,40925	0,419	
p value	ns		0,0222	0,0136	ns
n			31	34	
TPS	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =	0,38101	0,40925		0,46536	
p value	0,0345	0,0222		0,0083	ns
n	31	31		31	
TK	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =		0,419	0,46536		
p value	ns	0,0136	0,0083		ns
n		34	31		
Endostatin	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =					
p value	ns	ns	ns	ns	
n					

Tab. č. 12: Senzitivita(SN), PV+, PV-, RR a správnost pro jednotlivé markery pro rozlišení mezi strumami a benigními nádory při specificitě (SP) 90%

Metoda	SP	SN	PV-	PV+	RR	Správnost
VEGF	89,39%	23,80%	74,68%	46,15%	1,82	70,65%
TPS	89,87%	61,29%	85,54%	70,37%	4,87	81,82%
TK	89,66%	31,25%	78,00%	52,63%	2,39	73,95%
Endostatin	89,66%	30,43%	76,47%	53,85%	2,29	72,84%
bFGF	89,83%	20,00%	72,60%	45,45%	1,66	69,05%

Tab. č. 13: Párové vyhodnocení uzal vs normální tkáň u jednotlivých klinických případů

Diagnóza	VEGF	TPS	TK	bFGF
	ng/g proteinu	U/g proteinu	U/g proteinu	ng/g proteinu
U normal	146	38785	7	40,5
U uzal	1700	15489	17	187,9
KS norma	87	96515	15	340,4
KS uzal	1700	176119	30	361,7
KS norma	38	,	6	58,3
KS uzal	1700	124453	10	146,3
KS norma	87	46273	6	87,4
KS uzal	,	,	51	441,3
FA norma	94	68328	13	63,9
FA uzal	330	145000	21	222,3
PC norma	270	,	1	38,7
PC uzal	1700	,	6	234,5

VIII. Literatura

AACE Clinical Practice Guidelines: Thyroid Nodule guidelines, Endocrine Practice Vol. 12, No.1,2006, p 63-102

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381):1322–6.

Adler, Mc Auslan, Expression of thymidinkinase variants is a function of the replicate state of cells, *Cell* 1974, 2, 113-7

Achen MG., et al, VEGF-D is ligand for thy tyrosine kinases VEGFR-2 (Flk-1) and VEGFR, *Proc. Natl. Acad. Sci* 1998, 95, 548-553

Baird A. and Bohlen P. 1990; *Fibroblast Growth Factors in Peptide Growth Factors and their receptors*, Springer Verlag, New York, p. 369

Basolo F, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 2000;10(1):19–23.

Basolo F, et al. Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinico- pathological parameters, retinoblastoma gene product, and Ki67 labeling index. *Thyroid* 2000;10(9):741–6.

Bauer AJ, Terrell R, Doniparthi NK, Patel A, Tuttle RM, Saji M, Ringel MD, Francis GL Vascular endothelial growth factor monoclonal antibody inhibits growth of anaplastic thyroid cancer xenografts in nude mice. *Thyroid* 2002 12:953–961.

Bergstrom JD, Westermark B, Heldin NE. Epidermal growth factor receptor signaling activates met in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 2000; 259(1):293–9.

Boehm T, Folkman J., Browder T, Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance, *Nature* 1997, 390, 404-407

Branet F, et al. Expression of the cell death-inducing gene bax in carcinomas developed from the follicular cells of the thyroid gland. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996;81(7):2726–30.

Broet P, Romain S, Daver A, Ricolleau G, Quillien V, Rallet A, Asselain B, Martin PM, Spyrtos F. Thymidine kinase as a proliferative marker: clinical relevance in 1,692 primary breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2001 Jun 1;19(11):2778-87.

Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $(\alpha_v\beta_3)$ for angiogenesis. *Science* 1994;264:569-71.

Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am Pathol* 1999 155:1967–1976.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vascular endothelial growth factor allele. *Nature* 1996;380:435–439.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389–395.

Cohen Y, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95(8):625–7.

Correale, M. Arnberg H. et al: Clinical profile of a new monoclonal antibody based immunoassay for tissue polypeptide antigen; *The International Journal of Biological Markers* 1994, Vol 9 no.4, s. 231-238.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1582-4

Davies H, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54.

De la Torre NG, Buley I, Wass JA, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Sep;13(3):931-44.

Demidchik E et al, Thyroid cancer in Belarus, *International Congress Series* 1234 (2002) 69–75

Depoortere F, et al. Transforming growth factor $\beta(1)$ selectively inhibits the cyclic AMP-dependent proliferation of primary thyroid epithelial cells by preventing the association of cyclin D3-cdk4 with nuclear p27(kip1). *Molecular and Biology of the Cell* 2000;11(3):1061–76.

Dittati R., Meo S et al: Validation of blood collection procedures for the determination of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) in different compartments. *Int J Biol Markers* 2001, 16:87-96

Doležalová V et al *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*, IPVZ, Brno 1996

Dvořák J. , *Rakovina štítné žlázy*, kap Výskyt karcinomů štítné žlázy, Libri, Praha 1997, str. 24-34

Dumont JE, et al. Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991;5(4):727–54.

Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheres DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999;4:915–924.

EORTC Breast Cancer Cooperative Group; Revision of Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer, 1973, *Eur J Cancer* 9; 379 – 384

EORTC Breast Cancer Cooperative Group; Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer,, *Eur J Cancer Clin Oncol* 1980,16,1513-15

Erikson U. and Alitalo K., 1999; *Vascular Growth Factors and Angiogenesis*, Claesson-Welsh L. ed., Springer-Verlag; Berlin, 41-58

Esapa CT, et al. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1999;50(4):529–35.

Ewen ME, et al. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73(3):487–97.

Fagin JA. Molecular genetics of tumors of thyroid follicular cells. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner & Ingbar's the thyroid*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2000.p.886–98.

Fagin JA, et al. Reexpression of thyroid peroxidase in a derivative of an undifferentiated thyroid carcinoma cell line by introduction of wild-type p53. *Cancer Research* 1996;56(4):765–71.

Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocrine Reviews* 1994;15(2):202–32.

Fedi P. et al; *Growth Factors in Cancer Medicine* 4th Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1997

Fenton C, et al. The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. *Thyroid* 2000;10(4):349–57.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999;56:794–814.

Ferrara N, Carver Moore K, Chen H et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439–442.

Ferrara N., Henzel W.J.;, The Biology of VEGF /review/; 1997, *Endocrine Rew.*, 18, 4-25

Ferrara N : The Role of vascular endothelial growth factor –related molecules in tumor angiogenesis; *Kidney Int*, 1999; 56, 794-814

Folkman J. Tumour angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:206-32

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.

Folkman J. Tumour angiogenesis. In: Holland JF, Frei E III, Bast RC Jr, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR, eds. *Cancer medicine*. 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993:153-70.

Folkman J; *Tumor Angiogenesis in Cancer Medicine* 4th Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1997

Frauman AG, Moses AC. Oncogenes and growth factors in thyroid carcinogenesis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1990;19(3):479–93.

Fuchs, E. et al 1987 The human keratin genes and their differential expression. In *The Molecular and Developmental Biology of Keratins*. New York, Academic Press, 1987: s. 5-34.

Gaiso M.; Antiangiogenesis: a new anticancer treatment, *Medscape Oncology* 2(1), 1999

- Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999;13:1055–1066.
- Gilles SI, Romain S, Casellas P, Ouafik L, Fina F, Combes T, Vuaroquaux V, Seitz JF, Bonnier P, Galiegue S, Carayon P, Martin Mutation analysis in the coding sequence of thymidine kinase 1 in breast and colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. 2003 Jan-Mar;18(1):1-6.
- Gion M., Mione R. et al; CEA, Ferritin, TPA and CA15-3 in breast cancer : relationship between carcinoma and normal breast tissue, *Int. J Biol Markers* 1986, Vol 1, 1, 33-38
- Gion M et al Int.; Preliminary evaluation of Cyfra 21-1 in a lung cancer cytosol, *J Biol Markers* 1994, Vo 4, 4, 258- 259
- Giordano C, et al.Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis.*Science* 1997; 275(5302):960–3.
- Gottlieb TM, Oren M.p53 in growth control and neoplasia. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996;1287(2–3):77–102.
- Greco A, et al.Chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid specific TRK oncogenes. *Genes Chromosomes and Cancer* 1997; 19(2):112–23.
- Greco A, et al.The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Molecular and Cellular Biology* 1995;15(11):6118–27.
- Hahn Wook Kang, Jung Heyun No, Jae Hoon Chung, Yong-Ki Min, Myung-Shik Lee, Moon-Kyu Lee, Jung Hyun Yang, and Kwang-Won KimPrevalence, Clinical and Ultrasonographic Characteristics of Thyroid Incidentalomas, *THYROID* 2004, Volume 14, Number 1, 29-33
- Hall, P. A., Levison, D. A.: Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J. Clin. Pathol.*, 1990, 43: 184-192.

Hassan I, Wunderlich A, Slater E, Hoffmann S, Celik I, Zielke Antisense p53 Decreases Production of VEGF in Follicular Thyroid Cancer Cells. *Endocrine*. 2006 Jun;29(3):409-12.

Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Progress in Cell Cycle Research* 1995;1:9–19. *Cancer Research* 1988;48(18):5358–62.

He Q, Mao Y, Wu J, Decker C, Merza M, Wang N, Eriksson S, Castro J., Skog S.: Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumour marker for breast carcinomas., *Int J Oncol*. 2004 Oct;25(4):945-53.

Hedinger, C., Williams, E. D., Sobin, L. H.: *Histological typing of thyroid tumours*. 2nd edn. Berlin: Springer-Verlag, 1988.

Hirschi KK, d'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996;32:687–698.

Krah K, Mironov V, Risau W, Flamme I. Induction of vasculogenesis in quail blastodisc-derived embryoid bodies. *Dev Biol* 1994; 35, 352 -379

Holland et al in *Cancer Medicine* vol I, Section Cancer biology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1997

Holm R, Nesland JM. Retinoblastoma and p53 tumour suppressor gene protein expression in carcinomas of the thyroid gland. *Journal of Pathology* 1994;172(3):267–72.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1:149-53.

Hong FD, et al. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proceedings of the National Academy Science of the USA* 1989;86(14):5502–6.

Hung CJ, Ginzinger DG, Zarnegar R, Kanauchi H, Wong MG, Kebebew E, Clark OH, Duh QY Expression of vascular endothelial growth factor-C in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 88: 3694–3699.

Hung CJ, Ginzinger DG, Zarnegar R, Kanauchi H, Wong Tuttle RM, Fleisher M, Francis GL, Robbins RJ Serum vascular endothelial growth factor levels are elevated in metastatic differentiated thyroid cancer but not increased by short-term TSH stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 87:1737–1742.

Chard T. An Introduction to radioimmunoassay and related techniques, in Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, 4th Edition, Elsevier, 1990

Iitaka M., Miura S. et al; Increased serum vascular endothelial growth factor levels and intrathyroidal vascular area in patients with Graves' disease and Hashimoto thyroiditis, J Clin Endo and Metab. 1998, 83, 11, 3908 – 3912

Ito Y, et al. Expression of p21 (WAF1/CIP1) protein in clinical thyroid tissues. British Journal of Cancer 1996;74(8):1269–74.

Iwata I., Nishikaze O., Clin Chem 1979, 25/7:1317-1319

Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. Hum Pathol 1987;18:234-9.

Kaušitz J.: Radioimunoanalýza v onkologii, KC Solid, Rokycany, 1992

Khoo ML, et al. Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2002;87(4):1814–8.

Khoo ML, et al. Underexpression of p27/Kip in thyroid papillary microcarcinomas with gross metastatic disease. Archives of Otolaryngology—Head and Neck Surgery 2002;128(3): 253–7.

Kim DS, Buchanan MA, Stratford AL, Watkinson JC, Eggo MC, Franklyn JA, McCabe CJ. PTTG promotes a novel VEGF-KDR-ID3 autocrine mitogenic pathway in thyroid cancer. Clin Otolaryngol. 2006 Jun;31(3):246.

Kimura H, Weisz A, Kurashima Y et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. Blood 2000;95:189–197.

Kimura ET, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid

carcinoma. *Cancer Research* 2003;63(7):1454–7.

Klein M., Picard E. et al.,: Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma, 1999 *Journal of Endocrinology* 161, 41-49

Klener P: Mechanismus účinku látek s protinádorovou účinností. V: *Onkologie praktického lékaře*. Galén 1996, 65-105.

Klugbauer S, et al. Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Research* 1998;58(2):198–203.

Klugbauer S, Rabes HM. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1999;18(30):4388–93.

Krohn K, et al. Ras mutations are rare in solitary cold and toxic thyroid nodules. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2001;55(2):241–8.

Kuroi K and Toi M ; Circulating angiogenesis regulators in cancer patients, *Int J Biolog Markers* 2001, 16, 1, P 5-26

Learoyd DL, et al. RET/PTC and RET tyrosine kinase expression in adult papillary thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998;83(10):3631–5.

Leenhardt L, Aurengo A., Post-Chernobyl thyroid carcinoma in children, *Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol 14, No. 4, 2000 p 667- 677

Lejčko J. et al : Tymidinkináza jako nádorový marker, *Plz. Lék. Sborník Supp.*, 1991 64, 147 –149

Ludvíková, M., Ryška, A., Korabečná, M., Rydlová, M., Michal, M.: Oncocytic papillary carcinoma with lymphoid stroma (Warthin-like tumour) of the thyroid: a distinct entity with favourable prognosis. *Histopathology*, 2001, 39: 17-24.

Luxton R. Patel P., Keir G. Thomson E., *Clin Chem* 1989, 35/8: 416-418

Mansour EG. et al.; Tissue and plasma carcinoembryonic antigen in early breast cancer;Cancer 1983;124:3-1252

Máximo, V., Sobrinho-Simoes, M.: Hürthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch.*, 2000, 437: 107-115.

Mazzaferri E., *Diagnosis and Management of Papillary and Follicular Carcinomas*, in *Atlas of Endocrinology*, vol 1, Blackwell Science, Philadelphia 1999, p.76-80

Mitchell C., Parangi S: Angiogenesis in Benign and Malignant Thyroid Disease *THYROID* 2005 Volume 15, Number 6, p 494-510

Mitsiades N, et al.Fas ligand expression in thyroid carcinomas: a potential mechanism of immune evasion.*Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999;84(8):2924–32.

Mitsiades N., Poulaki V., Mitsiades C., Koutras D., Chrousos G.Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases,*TRENDS in Endocrinology & Metabolism* Vol.12 No.9 November 2001, 384-390

Mizuno T, et al.Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis.*Oncogene* 1997;15(12):1455–60.

Moll, R., Franke, WW., Schiller, DL., Geiger, B., Krepzler, R.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*1982, 31: s.11-24.

Moretti F, et al.p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells.*Oncogene* 1997;14(6):729–40.

Müller-Höcker, J.: Immunoreactivity of p53, and bcl-2 in oncocytic adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Hum. Pathol.*, 1999, 30: 926-933.

Nasir A, Catalano E, Calafati S, Cantor A, Kaiser HE, Coppola DRole of p53, CD44V6 and CD57 in differentiating between benign and malignant follicular neoplasms of the thyroid.

In Vivo. 2004 Mar-Apr;18(2):189-95

Němec J, Chytrý P, Dvořák J.: Závislost výskytu a přežití karcinomu štítné žlázy na pohlaví Vnitř lék 1996,42(9):602-604

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol 2000;18:1135–1149.

Neufeld G. Et al: Vascular Endothelial Factor and its receptors,, FASEB J 1999, 13, 9-22

Nikiforov YE, et al. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. Cancer Research 1997;57(9):1690–4.

Noden DM. Embryonic origins and assembly of blood vessels. Annu Rev Respir Dis 1989;140:1097–1103.

O'Neill KL. et al Serum thymidinkinase levels in cancer patients Ir J Med Sci 1986 , 155, 272-4

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell 1994;79:315-28.

O'Reilly MS. Boehm T. et al; Endostatin an endogenous inhibitor of angiogenesis and the tumor growth, Cell, 1997 88, 277-285

Pacini F., DeGroot L. in Endocrinology 4th Edition, W.B., Saunders Comp., 2001, Chapter 109 p. 1541

Pecen L, Koukalová H., Novák J., Široký P., Mrázová D., Hauerová D., Píkner R., Holubec L: The epidemiology of thyroid gland tumours in the Czech Republic-according to data of the National Oncology Register; Biomerkers and Environment 1999, 3-6

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1992;189:824-31.

Persico MG., Vincenti V and DiPalma T. 1999; Vascular Growth Factors and Angiogenesis, Claesson-Welsh L. ed., Springer-Verlag; Berlin, 31-40

Pierotti MA, et al. Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and Cheung CC, et al. Analysis of ret/PTC gene rearrangements in the needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001;86(5):2187–90.

Pollina L, et al. Bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer* 1996;73(2):139–43.

Portella G, et al. Human N-ras, TRK-T1, and RET/PTC3 oncogenes, driven by a thyroglobulin promoter, differently affect the expression of differentiation markers and the proliferation of thyroid epithelial cells. *Oncology Research* 1999;11(9):421–7.

Poulaki V, Mitsiades CS, McMullan C, Sykoutri D, Fanourakis G, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Mitsiades N. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 88: 5392–5398.

Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, Prinz RA, Xu X. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer*. 2005 Jun 1;103(11):2261-8.

Rajagopalan H, et al. Tumorigenesis: raf/ras oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418(6901):934.

Rak JW, St Croix BD, Kerbel RS. Consequences of angiogenesis for tumour progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs* 1995;6:3-18.

Robertson JFR et al, Thymidinkinase in breast cancer *Br J Cancer* 1990, 62, 663 –7

Romain S, Spyrtos F, Descotes F, Daver A, Rostaing-Puissant B, Bougnoux P, Colonna M, Bolla M, Martin PM. Prognostic of DNA-synthesizing enzyme activities (thymidine kinase and thymidylate synthase) in 908 T1-T2, N0-N1, M0 breast cancers: a retrospective multicenter study. *Int J Cancer*. 2000 Sep 15;87(6):860-8.

Rosai, J., Carcangiu, M. L., DeLellis, R. A.: Tumors of thyroid gland. In Washington, DC: A.F.I.P., 1992.
Rosai, J., Sobin, H.: editors. Atlas of tumor pathology, 3rd Series, Fascicle 5.

Saaristo A, Karpanen T. et al; Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumour growth and metastasis, *Oncogene* 2000, 19, 6122-6129

Said S, Schlumberger M, Suarez HG. Oncogenes and antioncogenes in human epithelial thyroid tumors., *Journal of Endocrinological Investigation* 1994;17(5):371–9.

Saji M, et al. Telomerase activity in the differential diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. *Surgery* 1997;122(6):1137–40.

Salabè G.B .Pathogenesis of thyroid nodules: histological classification? *Biomed Pharmacother* 2001 ; 55 : 39-53

Salassidis K, et al. Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinase to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Research* 2000;60(11):2786–9.

Sato K. et al ; Stimulation by TSH and Graves Immunoglobulin G of VEGF mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and in the rat in vivo, *J.Clin Invest.*, 21995 96, 1295 – 1302

Segev D.L., Umbricht Ch., Zeiger M., Molecular pathogenesis of thyroid cancer, *Surgical Oncology* 12 (2003) 69–90

Shalaby F, Ho J, Stanford WL et al. A requirement for Flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997;89:981–990.

Shushanov S. Bronstein M et al : VEGF_c and VEGFR3 expression in human thyroid pathologies, *Int. J. Cancer* 2000, 86, 47 -52

Son G. Y. et al : Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid, *J Clin Endo and Metab*, 1997 82, 11, 3741 – 3747

Spaní P, Heuvel J, Romain S, Piffanelli A, Martin PM, Geurts-Moespot A, Sweep F. EORTC receptor and biomarker study group report analytical and technical evaluation of a thymidine kinase radio-enzymatic assay in breast cancer cytosols. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr;20(2A):681-7.

Spaní P, Heuvel J, Romain S, Piffanelli A, Martin PM, Geurts-Moespot A, Sweep F. EORTC receptor and biomarker study group report analytical and technical evaluation of a thymidine kinase radio-enzymatic assay in breast cancer cytosols. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr;20(2A):681-7

Stabenow E, Tavares MR, Ab'Saber AM, Parra-Cuentas ER, de Matos LL, Eher EM, Capelozzi VL, Ferraz AR. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. *Clinics.* 2005 Jun;60(3):233-40. Epub 2005 Jun 13.

Stoscheck Ch: Quantification of protein in *Methods in Enzymology*, Academic Press INC, USA, 1990

Sündström, B.E., D'Amico, Y., Brundell, J.: Development of a new Profiligen TPA IRMA assay using monoclonal anti-cytokeratin antibodies. *The international Journal of Biological Markers* 1995, Vol 10 no.3, s. 166–173.

Tamai KT, Monaco L, Nantel F, Zazopoulos E, Sassone-Corsi P. Coupling signalling pathways to transcriptional control: nuclear factors responsive to c-AMP. *Rec Progr Horm Res* 1997 ; 52 : 121-39.

Teicher BA, Holden SA, Ara G, et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994;57:920-5.

The International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France;
<http://www-dep.iarc.fr/dataava/dataicon.htm>

Thomas GA, Williams D, Williams ED. Clonal origin of thyroid tumours. In: Wynford-Thomas D, Williams ED, Eds. *Thyroid tumours*. Edinburg: Churchill Livingstone; 1989. p. 38-56.

Troncone G, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) expression in thyroid cells obtained by fine-needle aspiration biopsy: a preliminary report. *Diagnostic Cytopathology* 2000;23(2):77–81.

Umbricht CB, et al. Telomerase activity: a marker to distinguish follicular thyroid adenoma from carcinoma. *Cancer Research* 1997;57(11):2144–7.

Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70(4):523–6.

Wang S, et al. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Modern Pathology* 2000;13(8):882–7.

Williams E.D.: Chernobyl 15 years later, correlation of clinical, epidemiological and molecular outcomes proceedings from A Decade of Advances in Thyroidology, Paris, 2002

Williams, E.D.: Two proposals regarding the terminology of thyroid tumors *Int. J. Surg. Pathol.*, 2000, 8: 181-183.

Wollman SH, Smeds S. Changes in thyroid blood vessels during the development of thyroid hyperplasia. In: Andreoli M, Monaco F, Robbins J, Eds. *Advances in thyroid neoplasia*. Italy; 1981. p. 1-10.

Wu J, Mao Y, He L, Wang N, Wu C, He Q, Skog S. A new cell proliferating marker: cytosolic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2000 Nov-Dec;20(6C):4815-20

Yalow R.S., Berson S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *J. Clin. Invest.*, 39, 1960, 1157–1175

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, An flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993;118:489–498.

Ye C, Feng C, Wang S, Wang KZQ, Huang N, Liu X, Lin Y, Li M. Antiangiogenic therapy of follicular thyroid carcinoma using soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 gene therapy. *Endocrinology* 2004 145: 817–822.

Ye C, Feng C, Wang S, Liu X, Lin Y, Li M. Antiangiogenic and antitumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology*. 2002 Sep;143(9):3522-8.

Závada M, Topolčan O et al, *Kontrola kvality RIA, ČS komise pro atomovou energii*, Praha 1982

Zedenius J, et al. Alterations of p53 and expression of WAF1/p21 in human thyroid tumors. *Thyroid* 1996;6(1):1–9.

Zeiger MA, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms. *Surgery* 1999;126(6):1195–8

IX. Seznam prací autora k problematice štítné žlázy

Práce vztahující se k problematice karcinomu štítné žlázy

1. Pecen L., Koukalová H., Novák J., Široký P., Mrázová D., Hauerová D., **Pikner R.**, Holubec L jr.: The Epidemiology of Thyroid Gland Tumours in the Czech Republic. According to data of the National Oncological Register, Biomarkers and Environment 1999, 3, p.6 (abstrakt)
2. Ludvíková M., Ryška A., **Pikner R.**, Hovorková E.: Assessment of MIB-1 Index in Oncocytic and Nononcocytic Thyroid Tumours of Follicular Cell Origin; Pathol. Internat 2000, 50, Suppl. A 67
3. Ludvíková M., Ryška A., **Pikner R.**, Hovorková E.: Cell Kinetics of Oncocytic and Nononcocytic Thyroid Tumours of Follicular Cell Origin Evaluated by MIB-1 Proliferative Rates Comparison; Biomarkers and Environment 2001, p 1-2
4. Ludvíková M., Topolčan O., Ryška A., **Pikner R.**, Hauerová D., Holubec L.: Tumor Markers in Thyroid Gland Lesions – Review of Problems with Emphasis on Angiogenesis, Abstrakt book of XXIX ISOBM Meeting, Barcelona 2001, p 201
5. **Pikner R.**, Ludvíková M., A. Ryška, I. Kholová, Holubec L. jr., Topolčan O., Pecen L.: Determination of VEGF, basic FGF, and Endostatin in Thyroid Tissue; Biomarkers and Environment, 2002, 15-18
6. **Pikner R.**, Ludvíková M., Holubec L. jr., Topolčan O.: Angiogenesis in Solid tumours and Thyroid Gland - review; Biomarkers and Environment, 2002, 19-23
7. Ludvíková M., Ryška A., Hovorková E., **Pikner R.**: Role proliferativního markeru MIB-1 v diagnostice a stanovení prognózy nádorů štítné žlázy., Česk. Patol. 2002, 38(1): 11-17
8. Kholova I, Ludvikova M, Ryska A, Topolcan O, **Pikner R.**, Pecen L, Cap J, Holubec L Jr. Diagnostic role of markers dipeptidyl peptidase IV and thyroid peroxidase in thyroid tumors. Anticancer Res. 2003 Mar-Apr;23(2A):871-5.

9. **Pikner R.**, Ludvíková M., A. Ryška, I. Kholová, Holubec L. jr., Topolčan O., Pecen L., Fínek J.: TPS, Thymidine Kinase, VEGF and Endostatin in Cytosl of Thyroid Tissue Samples; Anticancer Research 25: 1517-1522 (2005)
10. Ludvíková M (hlavní řešitel), **Pikner R.** (spoluředitel): Prognostické faktory proliferace a angiogeneze u nádorových onemocnění štítné žlázy. Závěrečná zpráva o řešení grantového projektu NC/5306-3, OK3, IGA MZ ČR (hodnocení B)

Práce vztahující se k problematice štítné žlázy

1. Eybl V., Kotyzová D., Sýkora J., **Pikner R.**, Mihaljevič M., Koutenský J., Brtko J., Glattre E. (2000): Effects of long-term administration of sodium tellurite and selenite on iodine cumulation and thyroid status in rats. - Abstracts of EUROTOX 2000, London, Toxicology Letters 1/116.
2. Eybl V., Kotyzová D., Sýkora J., Topolčan O., **Pikner R.**, Mihaljevič M., Koutenský J., Brtko J., Glattre E. (2000): Comparison of the effect of sodium selenite and tellurite on thyroid status and the activity of 5'-DI-I in rats. - Abstracts of 7 th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Venezia, October 2000.
3. Glattre E., Eybl. V., Kotyzová D., Mihaljevič M., **Pikner R.**, Topolčan O. : Blood serum level of TSH and thyroid hormones and thyroid tissue content of iodine in rats under restricted selenium and iodine supply. -Norwegian Journal of Epidemiology (2001) 11(2), 201-204.
4. **Pikner R.** -monograph reviewer : Demers, L.M. , Spencer C.A.: LABORATORY MEDICINE PRACTICE GUIDELINES -Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease , National Academy of Clinical Biochemistry 2002.
5. Hauerová D, **Pikner R**, Topolčan O, Mrázova D, Holubec L Jr, Pecen L. [Thyroid disease in pregnant women and its development after childbirth] Vnitr Lek. 2002 Nov;48(11):1060-4.
6. Hauerová D, **Pikner R**, Topolčan O, Mrázova D, Holubec L Jr, Pecen L. [Prevalence of thyroid gland disorders in pregnant women in the West Bohemia Region during their 2nd trimester of pregnancy in the year 2000-pilot study] Vnitr Lek. 2002 Jul;48(7):629-31.

7. Hauerová D, **Pikner R**, Topolčan O, Mrázova D, Holubec L Jr, Pecen L.: Tyreopatie v těhotenství a po porodu, *Gynekolog* 2002,5, 239-243.
8. Hauerová D, **Pikner R**, Topolčan O, Mrázova D.: Vliv těhotenství na metabolismus štítné žlázy matky, *Diabetologie, metabolismus, edokrinologie a výživa*, 2003 (6) 1, 33-35
9. Hauerová D, **Pikner R**, Topolčan O, Mrázova D.: Vliv těhotenství na metabolismus štítné žlázy matky, *Diabetologie, metabolismus, edokrinologie a výživa*, 2003 (6) 4,200-203
10. Mayer O Jr, Čech J, Rosolová H, **Pikner R**, Šimon J; Association between free thyroxin concentration nad degree of heart failure in chronic herat insuficiency. *Cas Lek Ces.* 2005;144(11):742-6
11. Mayer O Jr, Šimon J, Hrbková J, **Pikner R**, Topolčan O.; Epidemiological study of hypothyroidism as cardiovascular risk in population. *Cas Lek Ces.* 2005;144(7):459-64;discussion 464-5
12. **Pikner R.**: Laboratorní diagnostika poruch funkce štítné žlázy, *Encyklopedie laboratorní medicíny -CD nosič*, SEKK s.r.o, 2005, ISBN 80-238-9775-6
13. Mayer O jr, Šimon J., Filipovský J., Plasková M.,**Pikner R.**: Hypothyroidism in Coronary Heart Disease and its Realation to Selected Risk Factors, *Vasc. Health Risk Manag* 2006, 2(4);499- 506

X. Přílohy – publikace prací k řešenému tématu (1. autor)

Souhlasím s půjčováním doktorandské práce: Analýza cytozolu tkání štítné žlázy a její přínos v diferenciální diagnostice nodulárních lézí.

MUDr. Richard Pikner