

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

II. interní klinika

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

MUDr. Richard Pikner



Autoreferát doktorandské práce

Plzeň, 2007

Disertace byla vypracována v rámci kombinovaného studia v doktorandském postgraduálním studijním programu na
Lékařské fakultě UK v Plzni - II. Interní klinice

Uchazeč: MUDr. Richard Pikner

Školitel : prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.
nám. ředitelky FN Plzeň pro vědu a výzkum
vedoucí úseku inumonalýzy, ONM FN Plzeň

Oponenti : prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.
přednosta chirurgické kliniky LF UK a FN Plzeň

doc. MUDr. Jindřich Fínek, PhD.
přednosta RTO FN a LF UK Plzeň

MUDr. Miroslava Nekulová, CSc.
Oddělení Laboratorní medicíny , Masarykův onkologický ústav Brno

Stanovisko k disertaci vypracovala Lékařská fakulta UK v Plzni

Autoreferát rozelán dne : _____

Obhajoba se koná dne: 13.6.2007 v 10.00 hod před komisí pro obhajoby
doktorandských disertací v oboru vnitřního lékařství.

Místo obhajoby: LF UK Plzeň, Šafránkův pavilon, Alej svobody 31, 323 18, Plzeň

S disertací je možné se seznámit na děkanátu LF UK v Plzni, Husova 3, 305 06, Plzeň

prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.
Předseda oborové komise pro vnitřní lékařství

Souhrn :

Uzly štítné žlázy představují nejčastější endokrinní lézi v populaci, je nutné z nich rozlišit nádory štítné žlázy. Cílem práce bylo ověřit praktickou možnost užití cytozolových extraktů ke kvantitativnímu zkoumání vybraných faktorů angiogeneze, proliferace a apoptózy. Celkem bylo získáno 166 vzorků tkáně (85 strum, 34 benigních adenomů a 10 nádorů), u kterých byly v cytozolu stanoveny kvantitativně markery: VEGF, bFGF, Endostatin, Tymidinkináza a TPS. Odběr vzorku je jedním z hlavních úskalí celého postupu, nelze získat léze menší než 1cm³, variabilita je ovlivněna nehomogenitou vzorku. Jako optimální se jeví kromě tkáně léze získat i část zdravé tkáně jako individuální referenční normál

Byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými histologickými skupinami jak u pro-angiogenních (VEGF, bFGF), tak anti-angiogenních markerů (Endostatin) tak i v hodnotách proliferčních faktorů tymidinkinázy a TPS

Cytosolové markery nedosahují dostatečně významných rozdílů, aby je bylo možno použít k diferenciální diagnostice mezi strumami a benigními lézemi.

Nebyla prokázána signifikantní vazba mezi imunohistochemickými markery angiogeneze či proliferace a markery cytosolovými. Analýza cytozolu není schopna odhalit výkyvy v aktivitě či expresi jednotlivých analytů v jednotlivých fokusech odebraného vzorku, ale je schopna kvantitativně stanovit průměrné hodnoty daného markeru.

Abstract:

Thyroid nodules represent the most frequent endocrine lesion in our population and it is necessary to differentiate malignant lesions from them. The aim of the study was to validate determination of selected angiogenic, proliferative, and apoptotic markers in cytosol tissue extracts. We analysed 166 tissue samples (85 goitres, 34 benign adenomas and 10 malignant tumours in which VEGF, bFGF, Endostatin, Thymidinkinase and TPS were determined. Main limitation of cytosolic analysis is tissue sample volume, that must be about 1cm³ and interindividual variability caused by tissue sample heterogeneity. Best way is to compare normal with pathological tissue samples from one patient. We found significant differences among histological groups in VEGF, bFGF, Endostatin and mainly Thymidinkinase and TPS. These differences are not sufficiently huge to distinguish goitres and benign lesions.

We also did not find any correlation between cytosolic markers and immunohistochemistry markers. Cytosol analysis is not able to measure local expression and its differences in analysed tissue, but it is able to quantitatively determine mean levels of selected markers.

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. 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). Roční incidence se v USA pohybuje 0,1% (AAACE Clinical Practice Guidelines). Většina uzlů je tedy neškodná, o průměru do 1 – 1,5 cm, přesto jsou klinicky významné, neboť podíl maligních chirurgicky resekovaných uzlů se pohybuje mezi 10 – 30 %.

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. Ve světě se incidence karcinomů štítné žlázy pohybuje od 0,5 -10 případů /100 000 obyvateli. Je zde však trvalý trend v nárůstu incidence od roku 1972 do roku 1992 o 28%.

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).

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 Quiervainova 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.

I.4.A. Hyperplastický uzel

V experimentálních studiích byla prokázána dvoufázová reakce na strumigení podnět:

1. vaskulární reakce
2. replikace folikulárních buněk

Rozhodují roli v indukci hyperplazie hraje stimulace TSH receptoru a následná stimulace systémů cAMP/proteinkináza A, aktivace fosfolipázy C a aktivace fosfolipázy A2.

Nedílnou součástí vzniku hyperplazie štítné žlázy jsou tedy vzájemné interakce: autokrinní, parakrinní či hormonální.

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.

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 nodulárního průběhu není známa. Je zde asociace mezi lymfocytární infiltrací a rizikem vzniku lymfou štítné žlázy

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.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.

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	Váže HGF a stimuluje proliferaci tyreocytů
MYC	Účastní se kontroly růstu a diferenciaci
RAS	Zprostředkovává signály z receptoru pro tyrosine kinázu na kaskádu MAP kinázy
BRAF	Váže se na RAS a aktivuje MAP kinázovou kaskádu
RET/PTC	Tyrosine-kináza receptor,
cyclin D1	Mediátor progresu buněčného cyklu

Faktory bránící proliferaci nádorů

TGF-beta	Blokuje na cAMP závislou proliferaci tyreocytů
p21	Inhibitor Cyclin dependentní kinázy, efektor p53
p27	Inhibitor Cyclin cyklu
p53	Transkripční faktor,
E-Cadherin	

Faktory ovlivňující buněčnou imortalitu a smrt

Telomerase Reverse transcriptase	udržuje buňku živou prodlužováním telomer
Rodina Bcl proteinů	pro- či anti-apoptotická 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	

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.

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 morfologických, 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 kriteria . 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 řádky 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 medulárn karcinom

3. S100 protein u nádorů z Hürthleho buněk

galectin-3,

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

proliferální 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 parafínových bločcích či pomocí kvantifikace mRNA sledovaných parametrů. Vyšetřování řady těchto faktorů vede v současné době ke zlepšení diagnostiky maligních onemocnění štítné žlázy, jejich přesnějšímu 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) potencionální 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:

Bylo užito čerstvě získaných tkání. Tkáň byla ihned transportována na patologii, 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. Celkem bylo získáno 166 vzorků (85 strum, 34 benigních adenomů a 10 nádorů).

Příprava tkáňového extraktu (cytosolu)

Příprava cytosolu je rozhodující v celé analýze. Při této proceduře se tkáň zhomogenizuje, následně se homogenizát rozmíchá v elučním pupfru a centrifugací se získá supernatant, který se použije k analýze. Jako základ jsem vycházeli z doporučení EORTC, 1973 a 1980, ke stanovení estrogenových receptorů v tkáňové extraktu nádoru prsní žlázy. Homogenizace probíhala na mechanickém oscilačním homogenizátoru za stálého chlazení tekutým dusíkem K získanému homogenizátu se následně přidá eluční pufr. Vzniklá směs se po vyvážení centrifuguje po dobu 60 minut při 100 000x 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 optimální eluční pufr po testování byl vybráno složení Na₂HPO₄ 12 H₂O 1.8 g/L; NaH₂PO₄ 2 H₂O 0.78 g/L; Dithiothreitol 0.154 g/L ; K₂EDTA 0.61 g/L; Azid sodný 0.195 g/L; Glycerol 10% w/v; Molibdenan sodný 2.42 g/L.

Stanovení obsahu celkové bílkoviny v tkáňovém extraktu:

Analyzátor firmy Roche, analyzátor Hitachi 817. -bylo použito komerčně dodávaného setu na stanovení celkové bílkoviny v moči či mozkomíšním moku. Základem je

reakce bílkoviny s benzethonium chloridem v alkalickém prostředí a měří se vzniklá turbidita při 505 nm.

Stanovení VEGF v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy R&D Systems, USA. Jedná se o kvantitativní „sandwich“ nekompetitivní enzymoimunonalyzu.

Stanovení bFGF v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy R&D Systems, USA. Jedná se o kvantitativní „sandwich“ nekompetitivní enzymoimunonalyzu.

Stanovení Endostatínu v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy Chemicon International, USA. Jedná se o kvantitativní kompetitivní enzymoimunonalyzu.

Stanovení Thymidinkinázy v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané imunoanalytické soupravy od firmy AB Sangtec Medical, Švédsko. Jedná se o kvantitativní radioenzymoimunonalyzu. Ke stanovení v cytosolu byl použit TK cytosol kit, který standardizuje stanovení cytozolu.

Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS) v cytosolu

Bylo užito komerčně dodávané soupravy od IBL, Švédsko. Jedná se o kvantitativní nekompetitivní radioimunonalyzu.

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 testu. Na určení optimálních regresorů byla užita 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, zmenšil se rozsah souboru při uvažování obou skupin regresorů na téměř třetinu.

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 prvé 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 morfoloogicky 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 stanovené 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. 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 imunoanalytické 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 cytosolu 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 indexu 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. prokrvení 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, 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:

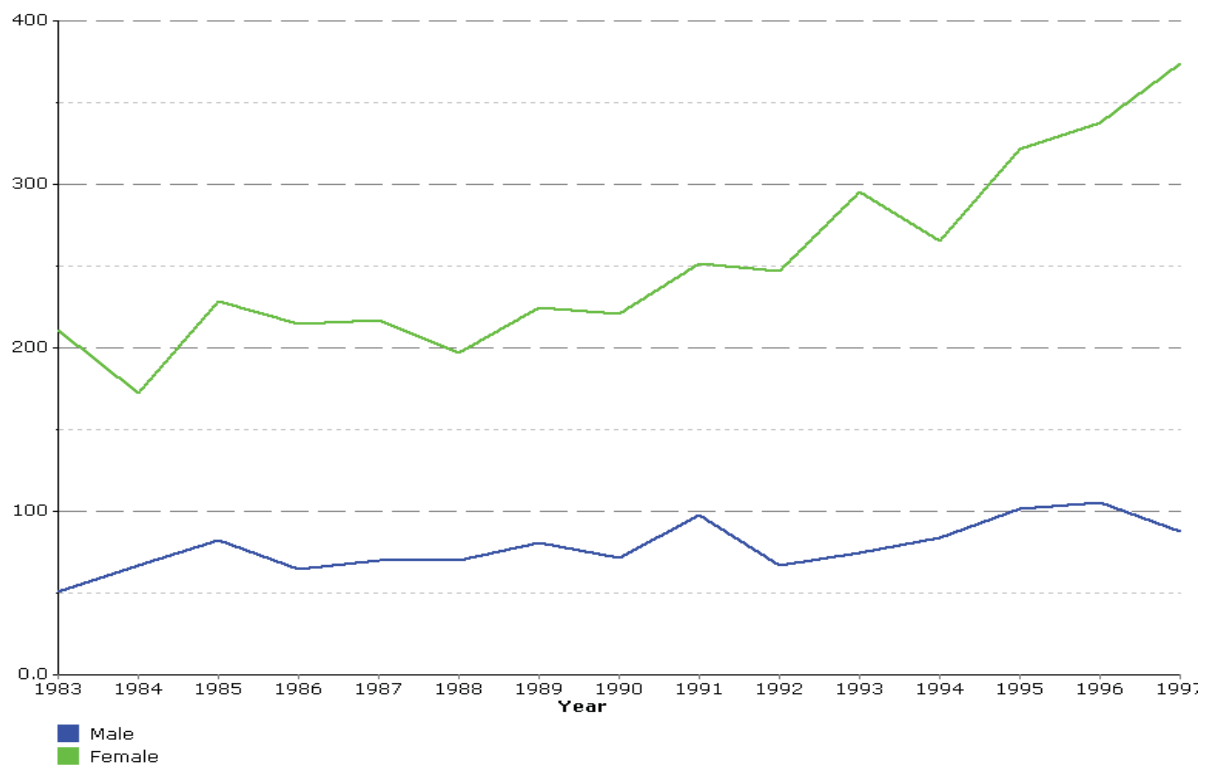
1. Byl vypracován a ověřen metodický postup odběru vzorků, uchování a extrakce cytosolu u vzorků tkáně štítné žlázy.
2. Odběr vzorku je jedním z hlavních úskalí celého postupu, nelze získat léze menší než 1cm³, variabilita je ovlivněna nehomogenitou vzorku.
3. Existují významné interindividuální rozdíly 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 proliferčních faktorů tymidinkinázy a TPS mezi jednotlivými histologickými skupinami.
7. Mezi proliferčními 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 imunohistochemií 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 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					
p value		<,0001	ns	ns	Ns	ns	ns
n		86					
bFGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =	0,41183			0,30085			
p value	<,0001		ns	0,0046	Ns	ns	ns
n	86			87			
TPS	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =				0,54779			
p value	ns	ns		<,0001	Ns	ns	ns
n				79			
TK	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =		0,30085	0,54779				
p value	ns	0,0046	<,0001		Ns	ns	ns
n		87	79				
Endostatin	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin	cd_31mean	MIB_1proc
r =		0,20185		0,20185			
p value	ns	0,0726	ns	0,0726		ns	ns
n		80		80			

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

VEGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =				0,87879	
p value		ns	ns	0,0008	ns
n				10	
bFGF	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =					
p value	Ns		ns	ns	ns
n					
TPS	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =					
p value	Ns	ns		ns	ns
n					
TK	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =	0,87879				
p value	0,0008	ns	ns		ns
n	10				
Endostatin	VEGF	bFGF	TPS	TK	Endostatin
r =					
p value	ns	ns	ns	ns	
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 uzlu 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 uzel	1700	15489	17	187,9
KS norma	87	96515	15	340,4
KS uzel	1700	176119	30	361,7
KS norma	38	,	6	58,3
KS uzel	1700	124453	10	146,3
KS norma	87	46273	6	87,4
KS uzel	,	,	51	441,3
FA norma	94	68328	13	63,9
FA uzel	330	145000	21	222,3
PC norma	270	,	1	38,7
PC uzel	1700	,	6	234,5

IX. Seznam prací – publikace prací k problematice štítné žlázy

Práce vztahující se k přímo řešené 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.: Assesment 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 Kinetice of Oncocytic and Nononcocytic Thyroid Tumours of Follicular Cell Origin Evaluated by MIB-1 Proliferative Rates Comparison; Biomarkes and Environment 2001, p 1-2
4. Ludvíková M., Topolčan O., Ryška A., **Pikner R.**, Hauerová D., Holubec L.: Tumor Markers in Thyroid Gland Lessons – Review of Probléme 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 proliferáčního 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. **IF 0,926**
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) **IF 0,926**

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. Úplný výčet publikační činnosti autora

Autor samostatných kapitol knih:

Pikner R. : Laboratorní diagnostika poruch funkce štítné žlázy a hesla kostního metabolismu Encyklopedie laboratorní medicíny -CD nosič, SEKK s.r.o, Pardubice 2005, ISBN 80-238-9775-6

Holubec L. jr., Holubec L. sen., Pikner R. : Etiologie a patogeneze kolorektálního karcinomu in Kolorektální karcinom – současné možnosti diagnostiky a léčby; Holubec L.sen a kol, Grada Publishing, Praha 2004

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

Publikace v impaktovaných časopisech: 20

Mayer O jr, Šimon J., Filipovský J., Plasková M.,Pikner R.: Hypothyroidism in Coronary Heart Disease and its Relation to Selected Risk Factors, Vasc. Health Risk Manag 2006, 2(4);499- 506

Mayer O Jr, Simon J, Holubec L, Pikner R, Trefil L;Folate co-administration improves the effectiveness of fenofibrate to decrease the lipoprotein oxidation and endothelial dysfunction surrogates. Pysiol Res. 2005;Dec 12

Mayer O Jr,Cech J, Rosolova H, Pikner R, Simon J; Association between free thyroxin concentration nad degree of heart failure in chronic herat insuficiency. Cas Lek Ces. 2005;144(11):742-6

Vyskocil V, Pikner R., Kutilek S; Effect of alendronate therapy in children with osteoporosis imperfecta. Joint Bone Spine. 2005 Oct;72(5):416-423

Mayer O Jr, Simon J, Hrbkova J, Pikner R, Topolcan O.; Epidemiological study of hypothyroidism as cardiovascular risk in population. Cas Lek Ces. 2005;144(7):459-64;discussion 464-5

Finek J, Holubec L jr., Topolcan O, Salvat J, Pikner R, Holdenrieder S, Stieber P, Lammerz R., Holubec L, Svobodova S, Visokai V, Helmichova E; Clinical relevance of tumor markers for the control of chemotherapy. *Anticancer Res.*2005, May-Jun;25(3A):1655-8

Holubec L jr., Topolcan O, Finek J, Holdenrieder S, Stieber P, Pesta M, Pikner R, Holubec L, Sutnar A, Liska V, Svobodova S, Visokai V, Kormunda S; Markers of cellular adhesion in diagnosis and therapy control of colorectal carcinoma. *Anticancer Res.*2005, May- Jun;25(3A):1597-601

Pikner R, Ludvikova M, Ryska A, Kholova I, Holubec L jr, Topolcan O, Pecen L, Finek J; TPS, thymidine kinase, VEGF and Endostati in cytosol of thyroid tissue samples. *Anticancer Res.*2005, May-Jun;25(3A):1517-21

Mayer O Jr, Simon J, Holubec L, Pikner R, Vobrubova I, Trefil; Fibrate treatment and prevalence risk of mild hyperhomocysteinaemia in clinical coronary heart disease patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2004 Jun;11(3):244-9.

Finek J, Holubec L Jr, Topolcan O, Pikner R, Suvova B, Treska; [Clinical importance of determination of tumor markers during follow-up in breast carcinoma]*Cas Lek Cesk.* 2004;143(3):174-7.

Mayer O Jr, Simon J, Holubec L, Pikner R, Subrt I. Fenofibrate-induced hyperhomocysteinemia may be prevented by folate co-administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003 Sep;59(5-6):367-71. Epub 2003 Jul 04.

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.

Holubec L Jr, Topolcan O, Pikner R, Pecen L, Holubec Sen L, Finek J, Ludvikova M, Cerna M. Criteria for the selection of referential groups in tumor marker statistical evaluation on the basis of a retrospective study. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr;23(2A):865-70.

Hauerova D, Pikner R, Topolcan O, Mrazova D, Holubec L Jr, Pecen L. [Thyroid disease in pregnant women and its development after childbirth] *Vnitr Lek.* 2002 Nov;48(11):1060-4.

Holubec L Jr, Topolčan O, Pikner R.[Biological activity in colorectal carcinoma] Cas Lek Cesk. 2002 Aug 16;141(16):508-12. Review. Czech.

Hauerova D, Pikner R, Topolčan O, Mrazova 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. Czech.

Nekulova M, Pecen L, Kalabova R, Simickova M, Topolčan O, Pikner R, Vondracek V, Valik D.Predicting response of ovarian cancer to paclitaxel treatment based on trend analysis of serum CA125. Clin Chem. 2002 Aug;48(8):1364-7.

Ludvikova M, Ryska A, Hovorkova E, Pikner R.[Role of the MIB-1 proliferative markers in the diagnosis and prognosis of tumors of the thyroid gland] Cesk Patol. 2002 Jan;38(1):4-10. Czech.

Holubec L. Jr., Pikner R., Topolčan O., Fínek J., Holubec L.sen, Pecen L: The Usefulness of Tumor Markers in Patients with Colorectal Carcinoma for the detection of Local Recurrences and DistatnMetastases, Coloproctology, 2001, 23: 26-31

Holubec L Jr, Topolčan O, Pikner R, Pecen L, Vaclavickova J, Wirthova M, Molacek J, Stieber P, Holdenrieder S, Sen LH, Finek J.The significance of CEA, CA19-9 and CA72-4 in the detection of colorectal carcinoma recurrence.Anticancer Res. 2000 20(6D):5237-44.

Publikace v časopisech bez impakt faktoru: 19

Holubec L.jr., Topolčan O., Fínek J., Pikner R., Černá M., Svobodová Š., Lipská L., Kormunda S., Holubec L. sen. Adhezivní molekuly: Referenční hodnoty u zdravých kontrol a pacientů s onemocněním GIT. Biomarkers and Environment. 2004, Sup. 1, p. 105-108.

Fínek, J., Holubec L., jr., Topolčan O., Pikner R., Sůvová B.Klinický význam stanovení nádorových markerů v průběhu follow up u karcinomu prsu.Časopis lékařů českých. 3/2004. Vol.143, str. 174 – 177

Holubec L. jr., Fínek J., Topolčan O., Třeška V., Pikner R., Holubec L. sen. Standardizace vyšetření nádorových markerů u kolorektálního karcinomu, Edukační sborník, XXVII. Brněnské onkologické dny 2003, p. 120-123. ISBN 80-239-0175-3

Hauerová D, Pikner R, Topolčan O, Mrázova D.: Vliv těhotenství na metabolismus štítné žlázy matky, Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa, 2003 (6) 1, 33-35

Hauerová D, Pikner R, Topolčan O, Mrázova D.: Vliv těhotenství na metabolismus štítné žlázy matky, Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa, 2003 (6) 4,200-203

Hauerová D, Pikner R, Topolčan O, Mrázova D, Holubec L Jr, Pecen L.: Tyreopatie v těhotenství a po porodu, Gynekolog 2002,5, 239-243.

Holubec jr. L., Topolčan O., Třeška V., Holubec sen. L., Pecen Ladislav, Pikner R., Finek J., Visokai V., Lipská L. - Detection of Secondary Liver Tumors in Patients with Colorectal Carcinoma by Using Tumor Markers. - Journal of Tumor Marker Oncology, Vol. 17, 2002, No. 3, pp. 134-135 (ISSN: 0886-3849),

Holubec L., jr., Fínek J., Topolčan O., Pikner R. Možnosti využití faktorů adheze a angiogeneze u nádorů prsu. Vybrané otázky z onkologie VI. Galén 2002, p. 124-129. ISBN 80-7262-196-3.

Topolčan O., Holubec L. Jr Pecen L., Pikner R., and Svobodova S.: Changes in values of tumor markers with pregnant woman in their 2nd trimester. In: Journal of Tumor Marker Biology, 2002, 17(3),s.121-123.

Holubec L. Jr., Topolčan O., Pecen L., Holubec L.sen., Finek J., Pecen L., Pikner R. : Tumor Markers in Malignant Tumors of Rectum . Biomarkers and Environment, Vol 5, No. 3,4, 2002, p. 28-33.

Fínek J., Holubec L., Topolčan O., Pikner R. Nádorové markery u karcinomu prsu: Ano či ne. Vybrané otázky z onkologie VI. Galén 2002, p.114-117 ISBN 80-7262-196-3.

Topolčan O., Holubec L. jr., Fínek J., Pikner R. Využití nádorových markerů pro prognózu karcinomu prsu. Vybrané otázky z onkologie VI. Galén 2002, p. 19-123. ISBN 80-7262-196-3

Glatte 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

Holubec L.jr., Pikner R., Topolčan O., Finek J., Holubec L. sen., Pecen L.: The Usefulness of Tumor Markers in Patients with Colorectal Carcinoma for the Detection of Local Recurrences and Distant Metastases. Coloproctology 23: 26-31; 2001.

Třeška V., Kočová J., Kreuzberg B., Šípová I., Pikner R.: Etiopatogeneze, diagnostika a léčba aneuryzmatu břišní aorty na přelomu tisíciletí, Praktická flebologie, 2001, 10, č. 1-2, s. 19-21

Holubec L jr., Topolčan O, Pikner R, Pecen L, Holubec L sen., Fínek J, Roušarová M, Václavíčková J, Wirthová M, Moláček J: „Changes of tumor Markers Values in Patients with Colorectal Carcinoma, Comparison of the results on the Basis of Differently Defined Groups of Patients with No Evidence of Disease and with Recurrence of Disease; Biomarkers and Environment Vol.3, No 1,2, 2000, p. 8-11.

Pikner R, Holubec L jr., Topolčan L, Pesek M, Fínek M, Suvova B, Toufarova P, Klecka J jr., Holubec L sen., Pecen L: Tumor Markers in Clinical Practice. When and Why; Plzensky lekarsky sbornik, Suppl. 72/1999; p.99-107; ISSN 0139-603x, ISBN 80-7184-989-8.

Klecka J jr., Pikner R, Toufarova P, Holubec L jr., Topolčan O, Pecen L: Cytokeratins TPA, TPS, Cyfra 21-1 a UBC in Serum and Urine as possible Tumor Markers of Urinary Bladder Cancer, Ceska urologie 1999.

Topolčan, O., Pikner R., Holubec L., Fínek J., Sůvová B., Třeška V., Pecen L.: Význam systematického sledování nádorových markerů u nádorů prsu. Sborník Vybrané otázky Onkologie III, p. 98-101, ISBN 80-86257-08-8, Galén 1999