

ODREĐIVANJE „UTRECHT SCORE-A“ I NJEGOVA POVEZANOST S KLINIČKIM PARAMETRIMA TE PROGNOZOM U PASA S HIPERADRENOKORTICIZMOM OVISNIM O NADBUBREŽNOJ ŽLIJEZDI

Raić, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:281419>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)
[Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Anja Raić

**ODREĐIVANJE „UTRECHT SCORE-A“ I NJEGOVA POVEZANOST S
KLINIČKIM PARAMETRIMA TE PROGNOZOM
U PASA S HIPERADRENOKORTICIZMOM OVISNIM
O NADBUBREŽNOJ ŽLIJEZDI**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

KLINIKA ZA UNUTARNJE BOLESTI

ZAVOD ZA VETERINARSKU PATOLOGIJU

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za unutarnje bolesti i Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom:

MENTORA: izv. prof. dr. sc. Ivane Kiš

izv. prof. dr. sc. Marka Hohštetera

Predstojnica Klinike za unutarnje bolesti: doc. dr. sc. Iva Šmit

Predstojnik Zavoda za veterinarsku patologiju: izv. prof. dr. sc. Marko Hohšteter

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Mirna Brkljačić
2. Izv. prof. dr. sc. Marko Hohšteter
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Kiš
4. Prof. dr. sc. Vesna Matijatko

Zahvala

Mnogo je onih koji su mi na razne načine bili podrška i motivacija tijekom studija kao i pri izradi samog diplomskog rada. Svatko od njih je na svoj način utjecao na to da sam danas ponosna što sam odabrala veterinarsku profesiju i što se osjećam pripremljena za budući rad, nova znanja kao i sve izazove koje zvanje veterinara nosi sa sobom.

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Ivani Kiš koja mi je bila velika podrška ne samo pri pisanju ovog diplomskog rada, nego i tijekom vremena koje sam provela volontirajući na Klinici za unutarnje bolesti. Hvala Vam na uloženom vremenu, razumijevanju, svim savjetima koje ste mi dali i na znanju koje ste mi nesebično prenijeli.

Mom mentoru, izv. prof. dr. sc. Marku Hohšteteru, hvala na trudu koji je uložio kako bi mi pomogao pri izradi ovog rada. Od pripreme uzoraka, bojanja, do analize i mikroskopiranja. Čak i onda kad je uzorak trebalo dopremiti iz Njemačke.

Hvala svim djelatnicima Klinike za unutarnje bolesti na svim prilikama koje su mi pružili tijekom volontiranja. Posebno hvala asistentici Efendić koja je uvijek bila tu za mene te doc. Grdenu i prof. Gračneru koji su bili izvrsni voditelji volontera. Hvala i cijeloj volonterskoj ekipi, mojim suborcima.

Hvala svim mojim VEF i ne-VEF prijateljima, a osobito hvala mojim VEF curama na predivnih 6 godina. Vi ste razlog što sam svaki dan s veseljem išla na fakultet.

Najviše hvala mojim roditeljima i bratu koji su mi najveća podrška u životu. Hvala što ste me uvijek poticali da se trudim, ustrajem i da budem najbolja verzija sebe. Hvala vam na pruženoj ljubavi. Vi ste mi najveći navijači.

Na kraju, hvala i svim mojim dlakavim čupavcima što me uveseljavaju svaki dan. Macama, pesonjama i puhu.

Popis korištenih kratica:

ACTH - adrenocorticotropic hormone (adrenokortikotropni hormon)

ACTHST - ACTH stimulation test (ACTH stimulacijski test)

ADH - adrenal dependent hyperadrenocorticism (hiperadrenokorticism ovisan o nadbubrežnoj žlijezdi)

ALP - alkalna fosfataza

ALT - alanin aminotransferaza

AT - adrenokortikalni tumor

BK - biokemijske pretrage

cPLI - canine pancreatic lipase immunoreactivity (pseća pankreasna lipaza)

CRH - corticotropin releasing hormone (kortikotropin oslobađajući hormon)

CRI - constant rate infusion (kontinuirana infuzija)

CT - computed tomography (kompjuterizirana tomografija)

DGGR lipaza - 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid (etilendiaminotetraoctena kiselina)

FSH - follicle-stimulating hormone (folikulostimulirajući hormon)

fT4 - slobodni tiroksin

HAC - hyperadrenocorticism (hiperadrenokorticism)

HDDST - high dose dexamethasone suppression test (test supresije visokom dozom deksametazona)

HE - hematoksilin-eozin

IHC – imunohistochemistry (imunohistokemija)

Ki67 IP - Ki67 indeks proliferacije

KKS - kompletna krvna slika

LDDST - low dose dexamethasone suppression test (test supresije niskom dozom deksametazona)

LH - luteinizing hormone (luteinizirajući hormon)

MI - mitotski indeks

MR - magnetska rezonancija

NAI - non adrenal illness (ne adrenalna bolest)

P/B ratio - pituitary-to-brain height ratio (omjer hipofize u odnosu na mozak)

PDH - pituitary dependent hyperadrenocorticism (hiperadrenokorticism ovisan o hipofizi)

PTE - plućna tromboembolija

PUPD - poliurija/polidipsija

SALP - steroid induced hepatic ALP isoenzyme (glukokortikoidima induciran hepatički ALP izoenzim)

ST - specifična težina

TSH - thyroid - stimulating hormone (tiroidni stimulirajući hormon)

TT4 - ukupni tiroksin

UCCR - urinary corticoid to creatinine ratio (omjer kortizola i kreatinina u urinu)

US - Utrecht score (Utrechtski bodovni sustav)

Popis priloga:

Tablica 1. Klinička manifestacija hiperadrenokorticisma kod pasa

Tablica 2. Laboratorijski nalazi kod pasa s hiperadrenokorticismom

Tablica 3. Ulazni kriteriji

Tablica 4. Lokacija tumora, veličina nadbubrežne žlijezde i uraštanje u *v. cavu caudalis/a.renalis*

Tablica 5. Debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde i debljina kontralateralne nadbubrežne žlijezde

Tablica 6. Adrenalni funkcijski testovi

Tablica 7. Histopatološka dijagnoza, histopatološki parametri i Utrechtski bodovni sustav

Tablica 8. Usporedba Utrechtskog bodovnog sustava sa stvarnim ishodom u istraživanoj skupini te individualna procjena prognoze i mogućnosti povrata tumora

Tablica 9. Utjecaj kliničkih parametara na vrijeme preživljenja

Slika 1. Ilustracija mogućih uzoraka LDDST-a

Slika 2. Dijagram toka pri interpretaciji rezultata LDDST-a

Slika 3. Dijagram toka pri interpretaciji ACTH stimulacijskog testa

Slika 4. Uzorci adrenokortikalnih tumora obojani hematoksilin-eozinom (lijevo) i imunohistokemijskim bojanjem za detekciju Ki67 pozitivnih stanica (desno)

Slika 5. Pasmenska zastupljenost u istraživanoj skupini

Slika 6. Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini

Slika 7. Starost i prosječna starost u vrijeme kirurškog zahvata

Slika 8. Tjelesna masa i prosječna tjelesna masa u istraživanoj skupini

Slika 9. Omjer kastriranih i nekastriranih pasa u istraživanoj skupini

Slika 10. Najčešći simptomi i njihova zastupljenost

Slika 11. Promjene u kompletnoj krvnoj slici

Slika 12. Promjene u biokemijskim parametrima

Slika 13. Promjene zabilježene pri analizi urina

Slika 14. Zabilježeni komorbiditeti kod istraživane skupine

Slika 15. Lokacija tumora

Slika 16. Izostanak supresije. Pacijent broj 4 iz tablice 6.

Slika 17. Izostanak supresije. Pacijent broj 5 iz tablice 6.

Slika 18. Parcijalna supresija. Pacijent broj 3 iz tablice 6.

Slika 19. Zastupljenost određenog tumora u istraživanoj skupini

Slika 20. Metastaza adrenokortikalnog karcinoma, nekrotično područje s krvarenjima, pas, HE x 20

Slika 21. Adrenokortikalni adenom, nekrotično područje s kariopiknotičnim jezgrama, crnom strelicom označena je kariopiknotična jezgra, pas, HE x 40

Slika 22. Adrenokortikalni adenom, crnom strelicom označena je vakuolizirana citoplazma stanice, pas, HE x 40

Slika 23. Adrenokortikalni adenom, crnom strelicom označena je vakuolizirana citoplazma stanice, pas, HE x 40

Slika 24. Adrenokortikalni adenom, crnom strelicom označena je stanica pozitivna na imunohistokemijski biljeg Ki67, pas, IHC x 40

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	4
2.1. Fiziologija osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda.....	4
2.2. Patofiziologija.....	4
2.2.1. Patofiziologija hiperadrenokorticisma ovisnog o ACTH.....	4
2.2.2. Patofiziologija hiperadrenokorticisma neovisnog o ACTH.....	5
2.3. Klinička slika.....	6
2.4. Laboratorijske pretrage.....	8
2.4.1. Kompletna krvna slika.....	9
2.4.2. Biokemijske pretrage.....	10
2.4.3. Analiza urina.....	10
2.5. Komorbiditeti.....	11
2.6. Slikovna dijagnostika.....	12
2.6.1. Rendgenološka pretraga.....	12
2.6.2. Ultrazvučna pretraga.....	12
2.6.3. Kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MR).....	14
2.7. Adrenalni funkcijski testovi („screening“ testovi).....	14
2.7.1. Test supresije niskom dozom deksametazona (LDDST).....	15
2.7.2. ACTH stimulacijski test (ACTHST).....	17
2.7.3. Omjer kortizola i kreatinina (UCCR) u urinu.....	18
2.7.4. Kombinirani UCCR (urine corticoid-to-creatinine ratio) s LDDST-om (low-dose dexamethasone suppression test).....	19
2.8. Okultni ili atipični hiperadrenokorticismam.....	19
2.9. Adrenalni funkcijski testovi za diferencijaciju.....	20
2.9.1. Mjerenje endogenog ACTH-a.....	20
2.9.2. Supresija deksametazonom.....	21

2.9.3. Kombinirani UCCR (urine corticoid-to-creatinine ratio) s HDDST-om (high-dose dexamethasone suppression test)	22
2.10. Histopatološka dijagnostika i Utrechtski bodovni sustav	22
2.11. Liječenje hiperadrenokorticisma.....	25
2.11.1. Liječenje hiperadrenokorticisma ovisnog o ACTH	25
2.11.2. Liječenje hiperadrenokorticisma neovisnog o ACTH	29
3. MATERIJALI I METODE	33
3.1. Statistička obrada.....	36
4. REZULTATI	37
4.1. Struktura istraživane populacije.....	37
4.2. Klinički simptomi	40
4.3. Laboratorijske pretrage	41
4.4. Komorbiditeti.....	44
4.5. Slikovna dijagnostika.....	44
4.6. Adrenalni funkcijski testovi	47
4.7. Histopatološki parametri.....	51
4.8. Usporedba kliničkih parametara s vremenom preživljenja.....	57
5. RASPRAVA	59
6. ZAKLJUČCI	66
7. POPIS LITERATURE	67
8. SAŽETAK	70
9. SUMMARY	72
10. ŽIVOTOPIS	74

1. UVOD

Hiperadrenokorticism je vrlo česta endokrinološka bolest kod pasa, čije je pojavljivanje znatno češće nego u ljudi i svih ostalih domaćih životinja. Hiperadrenokorticism je višesustavni organski poremećaj koji nastaje posljedično kronično povišenoj koncentraciji glukokortikoida u krvi. Ova se bolest naziva još i Cushingov sindrom, prema dr. Harveyu Cushingu koji je 1932. godine prvi put opisao taj poremećaj, a neki ovu bolest nazivaju i hiperkortizolizam jer od svih hormona najveći značaj u spontanim oblicima bolesti ima kortizol (HERAK-PERKOVIĆ i sur., 2012).

Spontani hiperadrenokorticism (HAC) jedna je od najčešćih endokrinoloških bolesti u pasa. Prema ovisnosti o lučenju ACTH (adrenokortikotropni hormon) bolest klasificiramo u dvije skupine: hiperadrenokorticism ovisan o ACTH-u (eng. ACTH-dependent) te hiperadrenokorticism neovisan o ACTH-u (eng. ACTH-independent). U pasa su opisana dva tipa hiperadrenokorticisma ovisnog o ACTH-u. To su hiperadrenokorticism ovisan o hipofizi (eng. PDH - pituitary dependent HAC) te ektopična produkcija ACTH. U pasa su prisutna i dva tipa hiperadrenokorticisma neovisnog o ACTH-u. To su adrenokortikalni funkcionalni tumori (AT) te HAC uzrokovan hranom (eng. food induced). Ektopična produkcija ACTH i hranom inducirani HAC izrazito su rijetki oblici ove bolesti (BENNAIM i sur., 2019a).

Hiperadrenokorticism se najčešće pojavljuje u pasa starijih od 6 godina. (BENNAIM i sur., 2019a). Više od 75% pasa s PDH-om i 90% pasa s adrenokortikalnim tumorom stariji su od 9 godina. Ženskog je spola oko 60-65% pasa s hiperadrenokorticismom (ETTINGER i sur., 2017). HAC se javlja sa nešto većom učestalošću u kastriranih životinja u odnosu na one koje nisu kastrirane. Iako ne postoji značajna pasminska predispozicija (ETTINGER i sur., 2017), veća je učestalost utvrđena u pasmina: pudl, jazavčar, kovrčavi bišon, standardni gubičar i foksterijer (BENNAIM i sur., 2019a). Oko 75% pasa s PDH-om lakše je od 20 kilograma, dok oko 50% pasa s adrenokortikalnim tumorom (AT) ima više od 20 kilograma (ETTINGER i sur., 2017).

Unatoč činjenici da se bolest javlja relativno često, dijagnostika ove bolesti predstavlja svojevrsan klinički izazov jer klinička slika može biti vrlo raznolika, a kod pojedinih pasa se

javljaju nespecifični simptomi. Laboratorijski nalazi su često varijabilni, a u dijagnostici postoje različiti endokrinološki testovi kojima se može potvrditi dijagnoza. Za postavljanje definitivne dijagnoze važna je i slikovna dijagnostika pri čemu se uz standardne dijagnostičke postupke poput rendgenologije i ultrazvuka koriste sve više kompjuterizirana tomografija (CT) i/ili magnetska rezonanca (MR).

Kako je već navedeno, tumori nadbubrežnih žlijezda se javljaju rjeđe nego o hipofizi ovisan HAC, te se već dugo istražuju načini kako bi se ovaj rjeđi oblik bolesti mogao bolje analizirati kroz kliničku sliku, laboratorijske nalaze, hormonalne testove, slikovnu dijagnostiku te na kraju i kroz patohistološke promjene nadopunjene raznim dodatnim najsuvremenijim postupcima u veterinarskoj patologiji. S tim ciljem u možda najvećem onkološkom veterinarskom centru Europe nastao je tzv. Utrechtski bodovni sustav koji se temelji na histopatološkoj analizi hormonalno aktivnih adrenokortikalnih tumora. Naime patohistološka podjela na adenome i karcinome nije bila od prognostičkog značaja, te je stoga uz osnovnu patohistološku procjenu izrađen novi sustav bodovanja koji uključuje 2 jasno razlučiva histopatološka parametra i Ki67 indeks proliferacije te dobro korelira s ishodom (SANDERS i sur., 2019).

Medicinska logika navodi nas da bi uz patohistološke parametre na ishod utjecaj trebali imati i parametri poput dobi pacijenta, prisutnosti komorbiditeta, trajanje i intenzitet metaboličkog poremećaja te eventualna proširenost bolesti. Stoga je u ovom istraživanju cilj bio da se provede Utrechtski bodovni sustav na uzorcima tumora nadbubrežnih žlijezda i da se uz to sakupi što više potencijalno relevantnih parametara za praćenje ovog oblika HAC-a kako bi u konačnici nakon analize svih podataka proizašle bolje preporuke za liječenje hiperadrenokorticisma ovisnog o nadbubrežnoj žlijezdi.

Ciljevi ovog istraživanja su utvrđivanje pasminske, spolne, dobne i ostalih predispozicija za pojavu ove bolesti, utvrđivanje zastupljenosti najčešćih simptoma u istraživanoj skupini pasa te utvrđivanje pojavnosti i zastupljenosti najčešćih laboratorijskih promjena i komorbiditeta koji prate hiperadrenokorticismam. Osim toga, u ovom će diplomskom radu biti promatrane karakteristike ovih tumora te metode njihove dijagnostike (slikovna dijagnostika, funkcijski testovi). Za svaki uzorak adrenokortikalnog tumora pomoću Utrechtskog bodovnog sustava biti će izračunat ukupan zbroj bodova, a ovisno o njemu bit će utvrđeno prosječno vrijeme

preživljenja. Ono će biti uspoređeno sa stvarnim vremenom preživljenja, a zaključno će se odrediti i eventualni utjecaj kliničkih parametara na vrijeme preživljenja.

Budući da je hiperadrenokorticismus ovisan o nadbubrežnoj žlijezdi (ADH) rjeđi oblik ove bolesti, te također da se veliki dio vlasnika i dalje teško odlučuje za kirurški zahvat (adrenalektomiju) ukupni brojevi pacijenata s ovim oblikom HAC-a koji su medicinski optimalno obrađeni su redovito relativno maleni na svim klinikama u odnosu na ukupni broj pacijenata kojima se dijagnosticira HAC. Zbog tih je razloga svaki pacijent, uključen u ovo istraživanje, bio vrlo značajan za analizu kako bismo doprinijeli dobrobiti i zdravlju pasa oboljelih od ovog rijetkog oblika bolesti.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Fiziologija osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda

Hipofiza se sastoji od tri dijela: adenohipofize tj. prednjeg režnja, *pars intermedia* tj. srednjeg režnja te neurohipofize tj. stražnjeg režnja. Adenohipofiza ima dva dijela: *pars infundibularis* i *pars distalis*. *Pars distalis* izvor je ACTH koji se izlučuje pod utjecajem kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) porijeklom iz hipotalamusa. Manji dio ACTH izlučuje se iz *pars intermedia* hipofize, pod kontrolom dopaminergične inhibicije (BENNAIM i sur., 2019a). Lučenje ACTH u pasa je pulzatorno te se maksimalna koncentracija ACTH postiže svakih 6-12 dana. (ETTINGER i sur., 2017) ACTH potom stimulira produkciju i sekreciju glukokortikoida iz nadbubrežnih žlijezda, a glukokortikoidi negativnom povratnom spregom smanjuju lučenje ACTH i CRH (BENNAIM i sur., 2019a). Kora nadbubrežne žlijezde sastoji se od tri zone: vanjska *zona glomerulosa*, srednja *zona fasciculata* i unutarnja *zona reticularis*. Dok *zona glomerulosa* proizvodi mineralokortikoide, tj. aldosteron, stanice *zone fasciculate* i *zone reticularis* proizvode kortizol i androgene hormone te njihove prekursore: 17-alfa-hidroksipregnenolon i 17-alfa-hidroksiprogesteron (ETTINGER i sur., 2017). Glukokortikoidi potiču glukoneogenezu u jetri, a u skeletnom mišićju i masnom tkivu smanjuju iskorištavanje glukoze tako da antagoniziraju djelovanje inzulina. Dovode i do katabolizma proteina, lipolize te djeluju imunosupresivno i protuupalno (BENNAIM i sur., 2019a).

2.2. Patofiziologija

2.2.1. Patofiziologija hiperadrenokorticisma ovisnog o ACTH

PDH tj. to jest, o hipofizi ovisan HAC najčešći je oblik hiperadrenokorticismu u pasa. Pojavljuje se u 80-85% pasa sa spontanim hiperadrenokorticismom. Uzrok je funkcionalni tumor hipofize koji autonomno izlučuje ACTH te tako dovodi do bilateralne adrenokortikalne hiperplazije i kronične pretjerane produkcije glukokortikoida. Većina, točnije oko 70% ovih tumora potječe iz *pars distalis* hipofize, dok ostatak potječe iz *pars intermedia*. (BENNAIM i

sur., 2019a). Tumori hipofize porijeklom iz *pars intermedia* obično narastu veći od onih porijeklom iz *pars distalis* hipofize (ETTINGER i sur., 2017). Ovisno o njihovoj veličini, dijele se na makrotumore i mikrotumore. Njihova veličina se procjenjuje na temelju omjera visine tumora u odnosu na područje mozga („tumour height to brain area ratio). Kod makrotumora je ovaj omjer $\geq 0.40 \times 10^{-2}mm^{-1}$, a kod mikrotumora je omjer $< 0.40 \times 10^{-2}mm^{-1}$ (BENNAIM i sur., 2019a). Histološki ih dijelimo na adenome, invazivne adenome i karcinome. Adenomi su dobro ograničeni od okolnog tkiva, dok se invazivni adenomi lokalno šire u okolni parenhim mozga. Karcinome obilježavaju intra- i ekstrakranijalne metastaze. Iako većina ovih tumora dovodi do bilateralne adrenokortikalne hiperplazije, moguća je i adrenokortikalna nodularna hiperplazija s pojavom hiperplastičnih nodula na jednoj ili obje nadbubrežne žlijezde. Ovo se ne smije zamijeniti s adrenokortikalnim tumorom, obzirom da su ova stanja makroskopski vrlo slična (ETTINGER i sur., 2017).

Ektopična sekrecija ACTH opisana je u 3 psa. Primjer pacijenta koji je bolovao od ovog oblika bolesti predstavlja 8 godina star njemački ovčar koji je nakon postavljene dijagnoze PDH podvrgnut hipofizektomiji. Unatoč hipofizektomiji, klinički su znakovi perzistirali te na histopatološkoj pretrazi u tkivu hipofize nije nađeno tumorozno tkivo. Daljnjom dijagnostikom ustanovljeno je da je uzrok ove bolesti bio neuroendokrini tumor, porijeklom od pankreasa koji je bio ektopični izvor ACTH (BENNAIM i sur., 2019a).

2.2.2. Patofiziologija hiperadrenokorticisma neovisnog o ACTH

U 15-20% pasa s hiperadrenokorticismom uzrok bolesti su adrenokortikalni tumori (AT) koji autonomno izlučuju kortizol. Suvišni kortizol negativnom povratnom spregom smanjuje lučenje ACTH i CRH te posljedično dovodi do atrofije stanica kontralateralne nadbubrežne žlijezde te atrofije onih stanica koje nisu neoplastično promijenjene, a nalaze se unutar kore tumorom zahvaćene nadbubrežne žlijezde. Većinu ovih tumora čine karcinomi, a nešto rjeđe javljaju se adenomi (BENNAIM i sur., 2019a). Adrenokortikalni tumori koji invadiraju lokalne krvne žile (npr. *v. cava caudalis*) ili su veći od 2 cm u promjeru, uglavnom su karcinomi (ETTINGER i sur., 2017). Iako su ovi tumori većinom unilateralni, zabilježeno je i nekoliko slučajeva bilateralnih adrenokortikalnih neoplazija. U vrlo malom broju slučajeva

(1.1%), moguća je istovremena pojava adrenokortikalnog tumora te funkcionalnog tumora hipofize (BENNAIM i sur., 2019a).

2.3. Klinička slika

Zbog pojačane svjesnosti doktora veterinarske medicine o ovoj bolesti, danas se pacijenti s hiperadrenokorticismom puno ranije otkrivaju, tj. puno se ranije u tijeku bolesti postavlja sumnja na HAC. Kliničku sliku stoga vrlo često obilježavaju blaži simptomi u vrijeme same dijagnostike bolesti. Provođenje dijagnostičkih postupaka u svrhu dokazivanja HAC-a trebalo bi raditi samo u onih pacijenata kod kojih se pojavljuje jedan ili više tipičnih kliničkih simptoma (BEHREND i sur., 2013). Ne postoji niti jedan standardni referentni test za dijagnostiku hiperadrenokortizma. Stoga se dijagnostika temelji na identifikaciji tipičnih kliničkih znakova i tipičnim laboratorijskim odstupanjima zajedno sa rezultatima funkcijskih testova (BENNAIM i sur., 2019a).

Tablica 1. Kliničke manifestacije hiperadrenokortizma kod pasa (Prema: Diagnosis of spontaneous canine hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM consensus statement, E.N. Behrend)

Često	Rjede	Rijetko
Poliurija (82-91%)	Letargija	Tromboembolija
Polidipsija (82-91%)	Hiperpigmentacija	Ruptura ligamenta
Polifagija	Komedoni	Paraliza n. facialisa
Endokrina alopecija	Loša kvaliteta dlake koja slabo raste	Pseudomiotonija
Abdominalna distenzija	Tanka koža	Atrofija testisa
Dahtanje	Inzulin-rezistentni diabetes mellitus	Perzistentni anestrus
Hepatomegalija	<i>Calcinosis cutis</i>	
Slabost mišićja	Curenje urina i urinarne infekcije (UTI)	
Sistemska hipertenzija	Pretilost	

Ako je prisutan samo jedan klinički simptom, uglavnom je to poliurija s kompenzatornom polidipsijom ili alopecije i promjene na koži (BEHREND i sur., 2013). Poliurija nastaje zbog kortizolom inducirane inhibicije djelovanja antidiuretskog hormona (ADH) što dovodi do smanjenje reapsorpcije vode u tubulima bubrega. Urinarna infekcija nastaje zbog imunosupresivnog djelovanja glukokortikoida, urinarne retencije te smanjenog baktericidnog djelovanja urina zbog njegove dilucije. Dio pasa s poliurijom ima i smanjen tonus mokraćnog mjehura što dovodi do tzv. „overflow” inkontinencije (ETTINGER i sur., 2017). Polifagija nastaje kao direktna posljedica visoke razine glukokortikoida, a dodatno ju pojačava *diabetes mellitus* ako je istovremeno prisutan. Abdominalna distenzija javlja se zbog hepatomegalije (depozicija glikogena u jetri), akumulacije masti u abdomenu, povećanog mokraćnog mjehura (poliurija) te smanjenog tonusa mišića (katabolizam proteina). Promjene na dlaci uglavnom započinju kao suha dlaka koja teško raste nakon šišanja. Ove promjene kasnije progrediraju u karakteristične bilateralno simetrične alopecije koje najčešće zahvaćaju trup (ETTINGER i sur., 2017). Alopecija nastaje zbog folikularne atrofije, a koža je tanka i zarastanje usporeno zbog inhibicije sinteze kolagena i anti-proliferativnog učinka na fibroblaste (BENNAIM i sur., 2019a). Na koži nalazimo komedone, seboreične promjene te hiperpigmentaciju. Životinje koje boluju od hiperadrenokorticisma sklonije su i pojavi masnica na koži (ETTINGER i sur., 2017). Piodermija će nastati sekundarno na brojne kožne promjene zbog imunosupresivnog djelovanja glukokortikoida (BENNAIM i sur., 2019a). *Calcinosis cutis* rijetka je, ali karakteristična promjena koja se javlja kod pasa s hiperadrenokorticismom (ETTINGER i sur., 2017). To je dermatološko stanje kod kojeg se radi odlaganja kalcija na abnormalna kolagena vlakna (BENNAIM i sur., 2019a) javljaju plakovi u koži ili ispod nje (ETTINGER i sur., 2017). *Calcinosis cutis* najčešće nalazimo na temporalnom području glave, po dorzalnoj liniji leđa, vratu, ventralnom abdomenu i ingvinalnom području (ETTINGER i sur., 2017). Sistemska je hipertenzija definirana kao povišenje sistoličkog tlaka iznad 160 mmHg (ETTINGER i sur., 2017). Javlja se u 38-86% pasa s neliječenim hiperadrenokorticismom (ETTINGER i sur., 2017), a češća je u pacijenata s adrenokortikalnim tumorom nego u onih s PDH (BENNAIM i sur., 2019a). Sistemska hipertenzija dovodi do proteinurije (ETTINGER i sur., 2017). Mineralokortikoidni receptori bubrega imaju jednak afinitet prema kortizolu i aldosteronu, a suvišak kortizola koji prati hiperadrenokorticism rezultira zauzimanjem mineralokortikoidnih receptora te tako nadmašuje učinak mineralokortikoida i dovodi do sistemske hipertenzije (BENNAIM i sur., 2019a). Slabost mišićja rezultat je kataboličkih učinaka glukokortikoida. Ponekad to rezultira otežanim ustajanjem nakon ležanja ili otežanim stajanjem. Javlja se i nestabilnost ligamenata, njihova ruptura te posljedično šepanje. Kod

nekastriranih ženki moguća je pojava anestrusa, dok se kod nekastriranih mužjaka javlja testikularna atrofija. Oba stanja nastaju zbog viška kortizola koji negativnom povratnom spregom utječe na hipofizu te tako smanjuje lučenje folikulo stimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Anestrus kod ženki obično traje onoliko koliko traje i sam hiperadrenokorticism, a testisi u mužjaka obično su mali i mekani (ETTINGER i sur., 2017). Od kliničkih simptoma koji su vezani uz direktni učinak tumorske mase kod PDH se javljaju neurološki simptomi (letargija, inapetencija, anoreksija, kruženje, stupor, besciljno lutanje, ataksija, promjene u ponašanju te napadaji) (BEHREND i sur., 2013). Nalaz tih nespecifičnih neuroloških simptoma ukazuje je na postojanje makrotumora u pacijenata s PDH-om (BENNAIM i sur., 2019a), no izostanak neuroloških znakova ne isključuje mogućnost makrotumora hipofize (BEHREND i sur., 2013). Psi s makrotumorom hipofize imaju niže vrijednosti tjelesne temperature i frekvencije rada srca nego oni s mikrotumorom. Razlog tomu je autonomna disfunkcija koja nastaje zbog kompresije tumora na hipotalamus (BENNAIM i sur., 2019a). Adrenokortikalni tumor može invadirati *v. phrenicoabdominalis*, *v. cavu caudalis* ili obje. To može dovesti do abdominalnog i/ili retroperitonealnog krvarenja (ETTINGER i sur., 2017) te posljedične abdominalne boli i anemije zbog gubitka krvi (BEHREND i sur., 2013). Formiranje tumorskog tromba dovodi i do pareze (BEHREND i sur., 2013) te edema stražnjih ekstremiteta (ETTINGER i sur., 2017). Rijetko se kod pasa s hiperadrenokorticismom javlja tzv. Cushingova pseudomiotonija. To je posebni oblik miotonije kod koje se nakon početka voljnog pokreta javlja perzistentna, aktivna kontrakcija mišića koja najčešće zahvaća stražnje ekstremitete te uzrokuje ukočen hod. Utvrđena je i korelacija između nagle stečene retinalne degeneracije i hiperadrenokorticisma. Mogući uzroci gubitka vida u pasa s PDH su povišena koncentracija triglicerida u serumu te promjene protoka u krvožilju retine (ETTINGER i sur., 2017). Izostanak tipičnih kliničkih znakova iz tablice 1., trebao bi značajno smanjiti sumnju na HAC. Što je prisutan veći broj kliničkih znakova iz tablice 1., to je vjerojatnost da je HAC prisutan veća (BEHREND i sur., 2013).

2.4 Laboratorijske pretrage

Laboratorijske abnormalnosti same po sebi nisu patognomonične za hiperadrenokorticism. Prema tome, prisutnost tipičnih laboratorijskih abnormalnosti ne potvrđuje hiperadrenokorticism, a isto tako njihov izostanak ne isključuje prisutnost ove bolesti (BEHREND i sur., 2013).

Tablica 2. Laboratorijski nalazi kod pasa s hiperadrenokorticismom (Prema: Diagnosis of spontaneous canine hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement, E.N. Behrend)

KKS (kompletna krvna slika)	BK (biokemijske pretrage)	Analiza urina
Neutrofilija	Povišen ALP	ST ≤ 1.018-1.020
Monocitoza	Povišen ALT	Proteinurija (62-80%)
Limfopenija	Hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija	Infekcija mokraćnih puteva (bakterijurija, pozitivna kultura urina) (10-50%)
Eozinopenija	Blaga hiperglikemija	
Blaga eritrocitoza	Povišen kreatinin	
Trombocitoza	Snižena ureja	
	Hipokalemija	

ST – specifična težina

2.4.1. Kompletna krvna slika

Hiperadrenokorticismam često prati nalaz tzv. stresnog leukograma. Ovaj tip leukograma nastaje zbog povišene koncentracije endogenih ili egzogenih kortikosteroida. Stresni leukogram obilježava istovremeni nalaz neutrofilije, monocitoze, eozinopenije i limfopenije. Neutrofilija i monocitoza rezultat su kapilarne demarginacije. Limfopenija nastaje zbog limfolize, a eozinopenija zbog sekvestracije u koštanoj srži. Moguća je pojava i eritrocitoze te trombocitoze koje nastaju zbog izravne stimulacije koštane srži glukokortikoidima. Eritrocitozi doprinosi i pretilost te hipoksemija kao posljedica hipoventilacije zbog slabosti mišićja. Moguća je i relativna eritrocitoza kao posljedica dehidracije povezane s poliurijom (BENNAIM i sur., 2019a).

2.4.2. Biokemijske pretrage

Alkalna je fosfataza (ALP) povišena u 85-95% pasa s hiperadrenokorticismom, a često je povišena i više od 10 puta iznad gornje referentne vrijednosti. Povišena koncentracija ALP-a javlja se zbog pojačane sinteze ALP izoenzima koji se naziva SALP („steroid-induced hepatic isoenzyme”) (ETTINGER i sur., 2017) te vakuolarne hepatopatije (BEHREND i sur., 2013). Za razliku od toga, povišenje alanin aminotransferaze (ALT) blago je do umjereno, a nastaje zbog oštećenja jetre povezanog s vakuolarnom hepatopatijom, akumulacijom glikogena ili hepatocelularnom nekrozom. Hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija prisutne su kod više od 50% pasa s hiperadrenokorticismom (ETTINGER i sur., 2017). Hiperkolesterolemija nastaje zbog lipolize, a hiperglikemija nastaje zbog pojačane glukoneogeneze u jetri te istovremenog smanjenog iskorištavanja glukoze u perifernim tkivima. Unatoč hiperglikemiji, koncentracija glukoze u krvi ostaje niža od bubrežnog praga tako da kod hiperadrenokorticismusa najčešće ne nalazimo glukozuriju. Ipak, u dva istraživanja dokazana je glukozurija u 8% pacijenata s HAC-om (BEHREND i sur., 2013). Snižene vrijednosti ureje nalazimo u 30-50% pasa s hiperadrenokorticismom (ETTINGER i sur., 2017). Koncentracija ureje snižena je zbog diureze (ETTINGER i sur., 2017), tj. pojačane eliminacije putem bubrega (poliurija) (BEHREND i sur., 2013). Azotemija je rijetka te kod pasa s azotemijom terapijsko liječenje hiperadrenokorticismusa nije indicirano. Iako je koncentracija fosfora u krvi najčešće snižena zbog njegove pojačane eliminacije putem bubrega, moguća je i pojava hiperfosfatemije zbog sekundarnog hiperparatireoidizma. U skladu s time, koncentracija kalcija u urinu često je povišena. Osim laboratorijskih abnormalnosti navedenih u tablici 2., moguć je i nalaz blago povišenih žučnih kiselina (BEHREND i sur., 2013). Uzrok povišenim pre- i post-prandijalnim žučnim kiselinama ostaje nejasan (BENNAIM i sur., 2019a).

2.4.3. Analiza urina

Zbog poliurije u 60% pasa s HAC-om specifična je težina urina < 1.015 . Glukoza u krvi uglavnom ne prelazi bubrežni prag pa je glukozurija rijetka (BENNAIM i sur., 2019a). Proteinurija se javlja u 62-80% slučajeva (BENNAIM i sur., 2019a), sa UPCr-om > 1.0 u 45%, tj. > 0.5 u 70% slučajeva (ETTINGER i sur., 2017). Kod 20-40% pasa s HAC-om

nastaviti će se perzistentni gubitak proteina putem urina unatoč kontroli hiperadrenokorticismom. Bakterijuriju i pozitivnu kulturu urina nalazimo kod 40-50% pasa s hiperadrenokorticismom (ETTINGER i sur., 2017). Ipak, znakovi infekcije donjih mokraćnih puteva rijetki su (<5%) zbog protuupalnog i imunosupresivnog djelovanja glukokortikoida (BENNAIM i sur., 2019a). Uzorak urina za bakteriološku pretragu trebalo bi uzimati cistocentezom (ETTINGER i sur., 2017).

2.5. Komorbiditeti

Pod pojmom komorbiditeta podrazumijevala se više nego slučajna prisutnost dva poremećaja ili bolesti u istog pacijenta bez prosuđivanja uzročnosti njihovog odnosa (JOKINEN i sur., 2015). Najčešći komorbiditeti uz spontani HAC su *diabetes mellitus* (10.5-13.5%), mukokela žučnog mjehura (1.6-23%), pankreatitis, urolitijaza (2.8%) te pulmonalna tromboembolija (2.7%). Kortizol promovira glukoneogenezu u jetri, dovodi do inzulinske rezistencije i posljedično do hiperglikemije. Postavljanje dijagnoze *diabetes mellitus*-a u pacijenata s HAC-om je često, no izazov predstavlja postavljanje dijagnoze HAC-a u pacijenata sa slabo reguliranim *diabetes mellitus*-om. Klinički se simptomi često preklapaju, a funkcijski testovi često su lažno pozitivni u pacijenata s *diabetes mellitus*-om. Mukokela žučnog mjehura nastaje zbog povišene koncentracije nekonjugiranih žučnih kiselina. One dovode do ozljede bilijarnog epitela te mucinozne hiperplazije s posljedičnim nastankom mukokele. Subklinički se pankreatitis javlja u pacijenata s hiperadrenokorticismom, što potvrđuje nalaz abnormalnih vrijednosti pankreasne lipaze (cPLI) u 25-35% pacijenata s HAC-om i povišena aktivnost DGGR lipaze u 50% pacijenata s HAC-om (BENNAIM i sur., 2019a). Unatoč tome, treba biti oprezan u dijagnosticiranju pankreatitisa u pasa s hiperadrenokorticismom. Nalaz povišenih vrijednosti cPLI-a uvijek treba tumačiti u skladu s kliničkim simptomima (ETTINGER i sur., 2017). Kalcijevi oksalati javljaju se zbog smanjene renalne tubularne reapsorpcije kalcija. Pulmonalna tromboembolija (PTE) nastaje zbog hiperkoagulabilnosti koju uvjetuju povećane vrijednosti fibrinogena, smanjena fibrinoliza i trombocitoza. Ovo stanje prate akutni respiratorni simptomi u vidu tahipneje, ortopneje i dispneje (BENNAIM i sur., 2019a).

Bitno je razlikovati pse s hiperadrenokorticismom od onih s hipotireoidizmom. Kod oba stanja javljaju se alopecične promjene, debljanje, letargija i hiperkolesterolemija. Isto tako kod obje bolesti nalazimo niske koncentracije ukupnog (TT4) i slobodnog tiroksina (fT4).

Glavna razlika na temelju koje možemo razlikovati ove dvije bolesti je nalaz normalne ili snižene koncentracije TSH kod HAC-a, odnosno nalaz normalne ili povišene koncentracije TSH kod hipotireoidizma. Isto tako, psi s hiperadrenokorticismom imaju izuzetno dobar apetit ili čak polifagiju, dok psi s hipotireoidizmom imaju slab apetit (ETTINGER i sur., 2017).

2.6. Slikovna dijagnostika

2.6.1. Rendgenološka pretraga

Rendgenološkom pretragom toraksa moguće je utvrditi prisutnost intersticijskog uzorka na plućima te mineralizaciju bronha ili trahealnih prstenova. U slučaju da je prisutna PTE na rendgenogramu pluća biti će vidljiva područja sa slabije izraženim, tj. slabije punjenim krvnim žilama. Ta područja nalaze se distalno od tromba te govore o smanjenoj perfuziji. Moguć je i nalaz alveolarnog uzorka koji odgovara atelektazama, krvarenjima ili infarktima. U pasa s PTE moguć je i nalaz povećane *a. pulmonalis*, povećanje desne strane srca te pleuralni izljev. Rendgenološkom pretragom abdomena moguće je utvrditi abdominalnu distenziju, hepatomegaliju i distenziju mokraćnog mjehura. Isto tako, kod ovih je pacijenata zbog povećanog sadržaja masti prisutan jako dobar rendgenološki kontrast. Ponekad je moguće vizualizirati i urolite koji sadržavaju kalcij. Također oko 50% adrenokortikalnih tumora mineralizira što omogućava njihovo rendgenološko prepoznavanje (ETTINGER i sur., 2017). *Calcinosis cutis* može biti primjetna u vidu mineralizacije kože i potkožnog tkiva (BEHREND i sur., 2013). Kod svih pasa s hiperadrenokorticismom obavezno treba napraviti rendgenološku pretragu kako bi se isključila moguća prisutnost metastaza (ETTINGER i sur., 2017).

2.6.2. Ultrazvučna pretraga

Pri ultrazvučnoj pretrazi najvažniji su parametri veličina nadbubrežne žlijezde te moguća vaskularna ili lokalna invazija tumora (BEHREND i sur., 2013). Nadbubrežne su žlijezde smještene kranio-medijalno od pripadajućeg bubrega te su normalno hipoehoične i plosnate (ETTINGER i sur., 2017). Značajno je teže ultrazvučno identificirati desnu nadbubrežnu

žlijezdu zbog njene manje veličine te kranijalnijeg i dubljeg smještaja u odnosu na lijevu nadbubrežnu žlijezdu. Vizualizaciju često otežava i prisutnost plina u cekumu (BENNAIM i sur., 2019b). Kod pasa s PDH ultrazvučno nalazimo bilateralno povećane nadbubrežne žlijezde, premda su nadbubrežne žlijezde kod 25% pasa s PDH normalne veličine (ETTINGER i sur., 2017). One su uglavnom simetrične, ali mogu pokazivati i blagu asimetriju (BEHREND i sur., 2013). Kod PDH s posljedičnom nodularnom hiperplazijom adrena, moguća je vizualizacija jedne ili više masa na nadbubrežnim žlijezdama (BENNAIM i sur., 2019b). Kao što je ranije navedeno, ovo stanje ne smije se zamijeniti s ultrazvučno vrlo sličnim adrenokortikalnim tumorima (ETTINGER i sur., 2017). Jaču asimetriju s kontralateralnom adrenokortikalnom atrofijom (<4-5 mm) te destrukciju normalne arhitekture tkiva nalazimo kod pacijenata s AT. Moguća je i bilateralna pojava adrenokortikalnih tumora (BEHREND i sur., 2013). Pri mjerenju veličine nadbubrežne žlijezde mjerimo širinu (mediolateralna dimenzija), duljinu (udaljenost od kranijalnog do kaudalnog pola) te debljinu (dorzoventralna dimenzija). U praksi je debljina najčešće korišten parametar za evaluaciju veličine nadbubrežne žlijezde. Debljina veća od 7.4 mm ukazuje na adrenokortikalni tumor, premda kod pasa u obzir moramo uzeti varijacije vezane uz pasminu, veličinu tijela te starost životinje. Kod pasmine labrador retriever, gornja referentna vrijednost za debljinu lijeve nadbubrežne žlijezde je 7.9 mm, a desne nadbubrežne žlijezde je 9.5 mm. S druge strane, gornja referentna vrijednost kod pasmine jorkširski terijer je 5.4 mm za lijevu nadbubrežnu žlijezdu i 6.7 mm za desnu nadbubrežnu žlijezdu (BENNAIM i sur., 2019b). BENTO i sur., (2016) utvrdili su da veličina nadbubrežne žlijezde u pasa ≤ 12 kg ne bi smjela biti veća od 0.62 cm, dok u pasa >12 kg ne bi smjela prelaziti 0.75 cm. Najbolja metoda za razlikovanje PDH od AT je mjerenje veličine manje nadbubrežne žlijezde. Ako je manja nadbubrežna žlijezda debljine do 5 mm to ukazuje na postojanje adrenokortikalnog tumora sa osjetljivošću 100% i specifičnošću od 96%. Dorzoventralna debljina manje nadbubrežne žlijezde varirala je od 2.00 do 5.00 mm kod pacijenata s hiperadrenokorticismom neovisnim o ACTH te od 5.00 do 15.00 mm kod pacijenata s hiperadrenokorticismom ovisnim o ACTH (BENCHEKROUN i sur., 2010). Iako se još uvijek smatra da su adrenokortikalni tumori >2 cm u promjeru češće karcinomi, na umu treba imati da je kod adrenalne hiperplazije zabilježen promjer do 3.7 cm. Prema tome, o malignosti tumora ne treba prosuđivati na temelju ultrazvučnih mjerenja (BENNAIM i sur., 2019b). Za određivanje malignosti tumora najbitnija je histopatološka pretraga, iako se invazija tumora u *v. cava caudalis* te lokalna tkiva često nalazi kod malignijih tumora. (BEHREND i sur., 2013).

2.6.3. Kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MR)

Kompjuteriziranom tomografijom (CT) možemo procjenjivati nadbubrežne žlijezde, ali i hipofizu. Pri procjeni veličine nadbubrežne žlijezde, koristan je tzv. omjer promjera nadbubrežne žlijezde (eng. adrenal diameter ratio) kod kojeg najveći promjer veće nadbubrežne žlijezde dijelimo s najvećim omjerom manje nadbubrežne žlijezde. Omjer > 2.08 upućuje nas na prisutnost adrenokortikalnog tumora (BENNAIM i sur., 2019b). Normalna veličina hipofize iznosi 3.2-5.1 mm u visinu, 4.2-6.9 mm u širinu te 3.6-7.2 mm u dužinu. CT lako prepoznaje makrotumore hipofize (>1 cm), no dijagnostički izazov predstavljaju pituitarni mikrotumori (<1 cm). Naime, u 56% pasa s PDH hipofiza će izgledati potpuno normalno tijekom CT snimanja. Zato se za vizualizaciju hipofiznih tumora preferira magnetska rezonanca (ETTINGER i sur., 2017). Prilikom procjene veličine hipofize mjerimo tzv. P/B omjer (eng. pituitary-to-brain height ratio). Omjer $> 0.31 \times 10^{-2} \text{mm}^{-1}$, dokaz je povećanja hipofize. Kao što je ranije objašnjeno, ovaj će omjer kod pituitarnih makrotumora biti $\geq 0.40 \times 10^{-2} \text{mm}^{-1}$, a kod mikrotumora $< 0.40 \times 10^{-2} \text{mm}^{-1}$ (BENNAIM i sur., 2019a).

2.7. Adrenalni funkcijski testovi („screening” testovi)

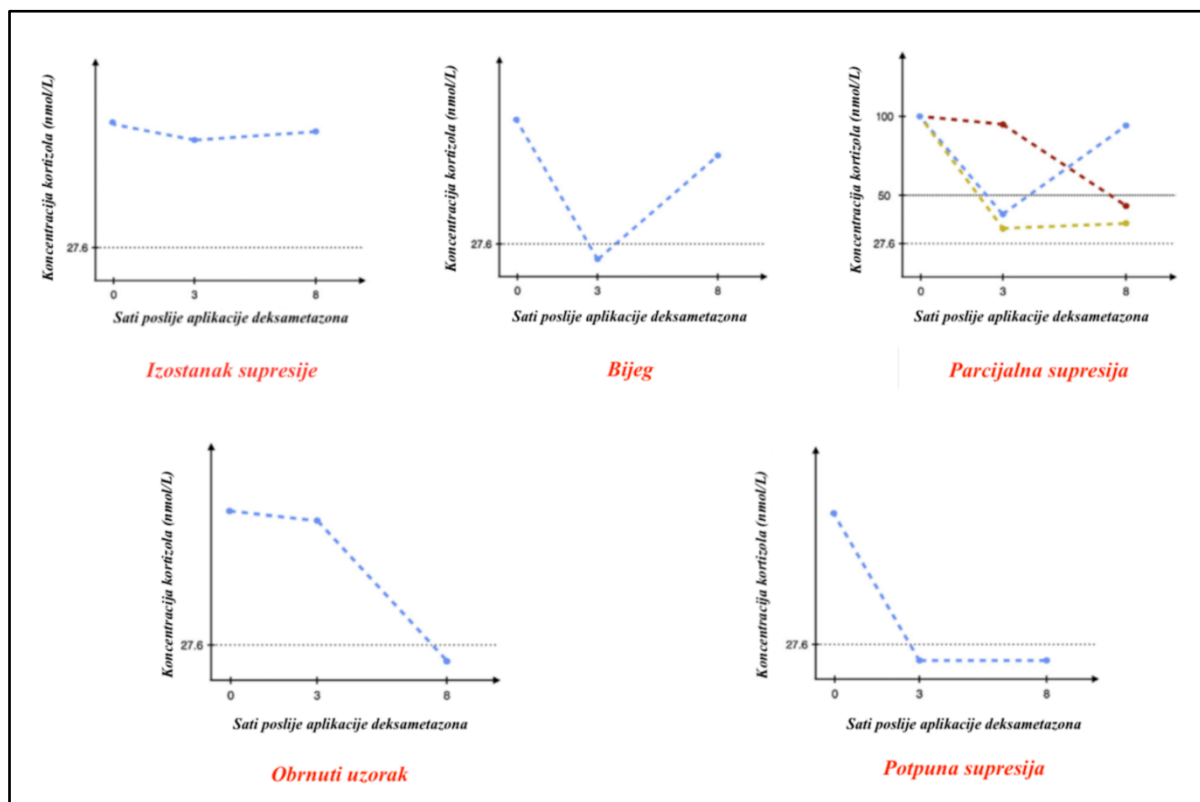
Dijagnoza HAC-a zasniva se na dokazu povećane produkcije kortizola ili smanjene osjetljivosti osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda na negativnu povratnu spregu glukokortikoidima. Dokaz jednokratno povišene koncentracije bazalnog kortizola nema nikakvu dijagnostičku vrijednost jer se ona može pojaviti i kod pacijenata koji imaju bolesti koje nisu povezane s nadbubrežnom žlijezdom (eng. NAI - non adrenal illness). Koncentracija bazalnog kortizola ovisi o lučenju ACTH, a ono je pulzatorno te stoga koncentracija bazalnog kortizola ponekad može odstupati od referentnog intervala (BEHREND i sur., 2013).

Najčešće rabljeni dijagnostički testovi su LDDST (test supresije niskom dozom deksametazona), ACTH stimulacijski test te UCCR (omjer kortizola i kreatinina u urinu). Niti jedan od ovih testova nije idealan i svaki od njih može biti negativan kod pacijenata koji imaju HAC. Ako je test kojeg prvog provodimo negativan, a klinička je sumnja i dalje prisutna, onda se preporuča provođenje drugog testa. Ako je rezultat dvaju ili više testova negativan, postoji velika vjerojatnost da pacijent nema HAC. Pacijenti koji imaju blagi oblik

ove bolesti često imaju negativan rezultat na testiranju te se kod njih preporuča ponovno testiranje za 3-6 mjeseci u slučaju da klinički simptomi progrediraju (BEHREND i sur., 2013).

2.7.1. Test supresije niskom dozom deksametazona (LDDST)

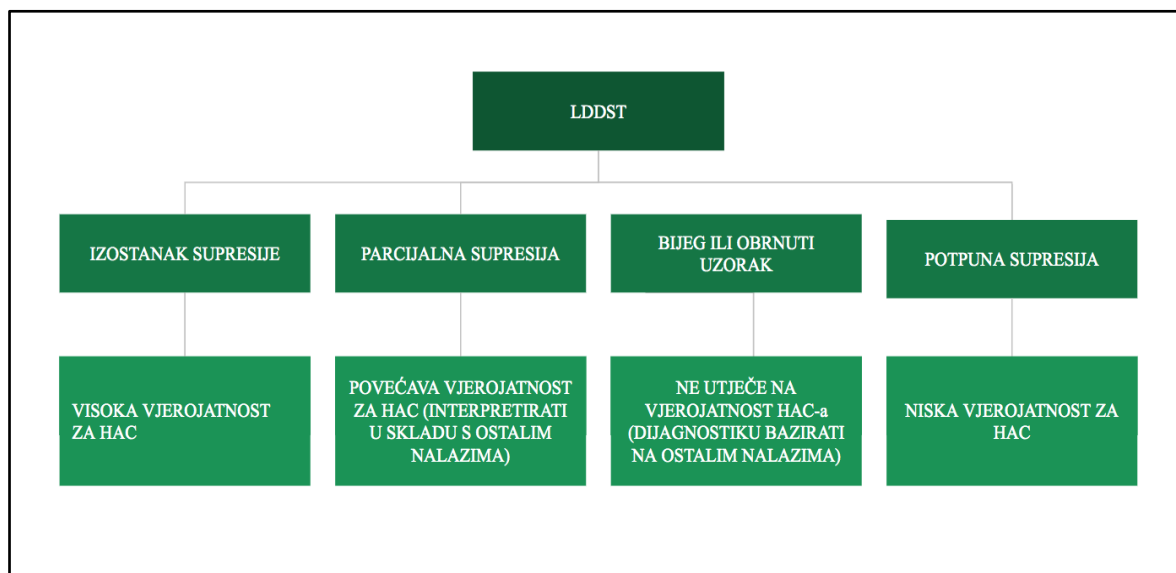
Test niskom dozom deksametazona zasniva se na demonstraciji smanjene osjetljivosti osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda na negativnu povratnu spregu glukokortikoidima. Osjetljivost testa je 85-97% (BENNAIM i sur., 2019b). LDDST je test prvog izbora u svim slučajevima, osim u slučaju dijagnostike jatrogenog hiperadrenokorticisma, kada biramo ACTH stimulacijski test. Test možemo izvoditi u bilo koje doba dana jer kod pasa izlučivanje kortizola nije cirkadijalno. Prilikom izvođenja testa nije preporučeno hranjenje životinje. No, životinja prije izvođenja ovog testa ne mora biti natašte (osim ako lipemija ima utjecaj na laboratorijsko određivanje koncentracije kortizola, što treba provjeriti s laboratorijem). Test se izvodi aplikacijom 0.010-0.015 mg/kg deksametazon natrijevog fosfata intravenski. Uzorke krvi uzimamo neposredno prije aplikacije deksametazona, a onda 4 te 8 sati nakon aplikacije. Kod ovog se testa dijagnostika HAC-a temelji na vrijednostima kortizola 8 sati nakon administracije deksametazona. Vrijednosti kortizola koje su iznad „cut-off” granice, tj. iznad 40 nmol/L su abnormalne i konzistentne su s HAC-om (BEHREND i sur., 2013). Mogući uzorci krivulje kod LDDST-a su izostanak supresije, parcijalna supresija, bijeg, obrnuti uzorak i potpuna supresija (BENNAIM i sur., 2019b). Kod pacijenata koji primaju fenobarbiton radi epilepsije, dijagnostika HAC-a je otežana zbog toga što dugotrajno uzimanje fenobarbitona često rezultira sličnim simptomima kakve nalazimo kod primarnog HAC-a. Zato je preporučljivo sve pacijente koji primaju fenobarbiton prebaciti na neki drugi antiepileptik, te u slučaju da klinički simptomi HAC-a perzistiraju tek onda provesti testiranje na hiperadrenokorticismam. Na rezultate testa može utjecati administracija glukokortikoida i progestagena koja će dovesti do supresije osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (BEHREND i sur., 2013).



Slika 1. Ilustracija mogućih uzoraka LDDST-a (Prema: Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 2: Adrenal function testing and differentiating tests, M. Bennaïm, 2019b)

Na slici 1. korištena je „cut-off” vrijednost od 27.6 nmol/L. Izostanak supresije prisutan je kada su koncentracije kortizola 3, 4 i 8 sati nakon aplikacije deksametazona iznad laboratorijski određenih „cut-off” vrijednosti i kada su one >50% bazalne koncentracije kortizola (BENNAÏM i sur., 2019b). Izostanak supresije konzistentan je s hiperadrenokorticismom, no ne omogućava daljnje razlikovanje PDH od AT (ETTINGER i sur., 2017). Parcijalna supresija javlja se kada su vrijednosti kortizola 3, 4 i 8 sati poslije aplikacije deksametazona iznad „cut-off” vrijednosti, ali je bilo koja od vrijednosti <50% bazalnog kortizola (BENNAÏM i sur., 2019b). Ovaj se uzorak najčešće javlja kod pasa s PDH-om (ETTINGER i sur., 2017). Kod bijega je koncentracija kortizola 3 ili 4 sata poslije aplikacije deksametazona ispod, a koncentracija kortizola 8 sati poslije aplikacije deksametazona iznad „cut-off” vrijednosti (BENNAÏM i sur., 2019b). Bijeg tj. „V” uzorak konzistentan je s PDH, javlja se u 30% pasa s PDH-om te daljnji testovi za razlikovanje PDH od AT nisu potrebni (ETTINGER i sur., 2017). Kod obrnutog uzorka su koncentracije kortizola 3 i 4 sata poslije aplikacije deksametazona iznad, a koncentracija kortizola 8 sati poslije aplikacije deksametazona ispod „cut-off” vrijednosti. Obrnuti je uzorak zabilježen kod

5 pasa s PDH. Ovakav bi uzorak trebao pobuditi sumnju na HAC te bi trebalo provesti daljnje metode dijagnostike. Potpunu supresiju prate koncentracije kortizola koje su 3, 4 i 8 sati poslije aplikacije deksametazona ispod laboratorijski određenih „cut-off” vrijednosti. Ovaj uzorak nalazimo kod zdravih pacijenata (BENNAIM i sur., 2019b).

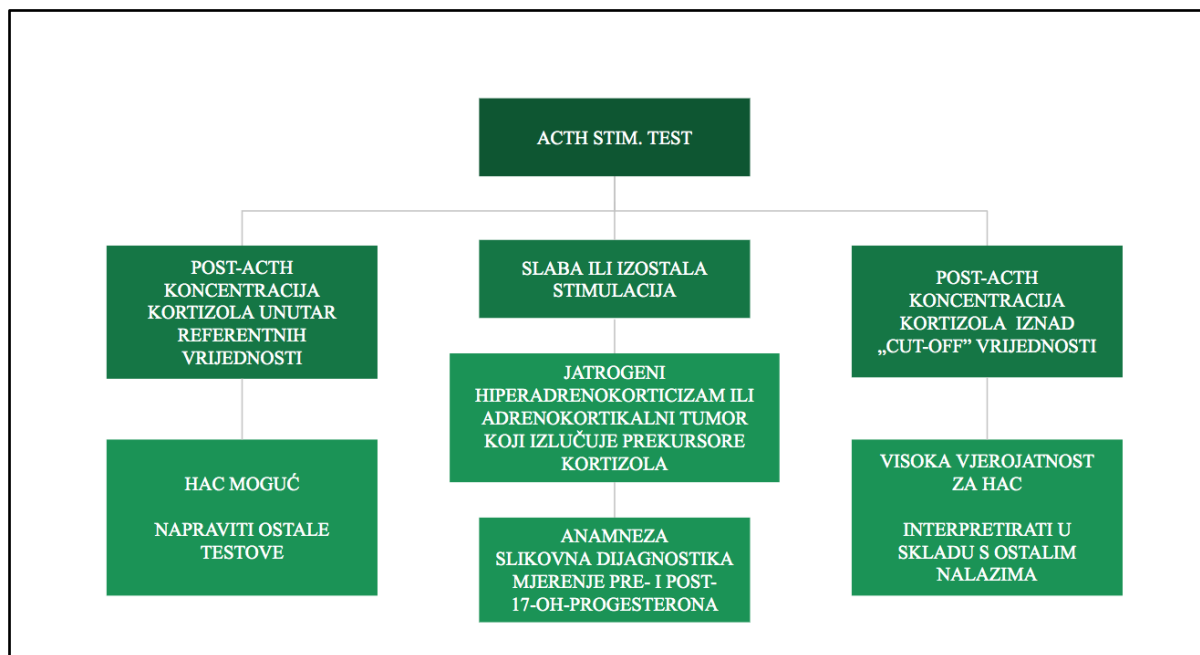


Slika 2. Dijagram toka pri interpretaciji rezultata LDDST-a (Prema: Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 2: Adrenal function testing and differentiating tests, M. Bennaim, 2019b)

2.7.2. ACTH stimulacijski test (ACTHST)

ACTH stimulacijski test je zlatni standard za dijagnostiku jatrogenog hiperadrenokorticisma. Sastoji se u aplikaciji sintetičkih polipeptida koji sadržavaju 24 aktivne aminokiseline ACTH-a. To su Cortrosyn (cosyntropin) i Synacthen (tetracosactide) (BEHREND i sur., 2013). Sintetski ACTH dostupan je u tekućem, liofiliziranom i depot obliku. Aplicira se 5 µg/kg ili 250 µg/psu tetrakosaktida s uzimanjem uzoraka krvi prije aplikacije te 60-90 minuta po aplikaciji pripravka. Tetrakosaktid se može aplicirati intramuskularno ili intravenski, premda je intramuskularna aplikacija često bolna. Bioaktivnost tetrakosaktida očuvana je 6 mjeseci ako se preparat čuva pohranjen na -20 °C. Moguća je i intramuskularna aplikacija 2.2 IU/kg ACTH gela. Kao i kod LDDST, test možemo izvoditi u bilo koje doba dana, izbjegava se hranjenje prilikom izvođenja testa te u većini slučajeva nije potrebno da je životinja natašte. Osjetljivost ovog testa kod pasa s funkcionalnim AT je 0-63 %, dok je kod pasa s PDH

značajno viša i iznosi 80-92%. Kod pasa s funkcionalnim AT veća je učestalost lažno negativnih rezultata. Specifičnost ACTH stimulacijskog testa je 59-95%. Iako najčešće korištena post-ACTH „cut-off” vrijednost kortizola iznosi 550-600 nmol/L, povišanjem „cut-off” vrijednosti na 683 nmol/L, povisuje se i specifičnost ovog testa na 94% uz osjetljivost od 86% (BENNAIM i sur., 2019b).



Slika 3. Dijagram toka pri interpretaciji ACTH stimulacijskog testa (Prema: Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 2: Adrenal function testing and differentiating tests, M. Bennaim, 2019b)

2.7.3. Omjer kortizola i kreatinina (UCCR) u urinu

Omjer kortizola i kreatinina (UCCR) određuje se u urinu te je osjetljivost (92-100%) ovog testa visoka (BENNAIM i sur., 2019b). Kako bi se maksimalno izbjegao utjecaj stresa kojeg životinje doživljavaju u klinici te samim time i lažno pozitivan rezultat, najbolje bi bilo kada bi vlasnici urin prikupili kod kuće (BEHREND i sur., 2013). Urin se može prikupiti i u klinici, neposredno nakon kliničkog pregleda te vađenja krvi. To predstavlja kratkotrajni stres koji ne dovodi do značajnog porasta koncentracije kortizola. Međutim, provođenje ovog testa u stacioniranih pacijenata trebalo bi se izbjegavati. Kod stacioniranih je pacijenata zamijećena znatnija razina stresa pa samim time i značajan porast kortizola u urinu (BENNAIM i sur., 2019b). Iako se UCCR može određivati u urinu prikupljenom u bilo kojem dijelu dana,

preferira se jutarnji urin jer predstavlja višesatni odraz produkcije urina. UCCR mogu povisiti i druga stanja koja nisu povezana s nadbubrežnom žlijezdom te povišeni UCCR treba oprezno interpretirati, obavezno u korelaciji s kliničkom slikom. Na ovaj test utječe administracija glukokortikoida i progestagena koji dovode do supresije te posljedično smanjenog UCCR-a. Terapija fenobarbitonom ne utječe na ovaj test (BEHREND i sur., 2013). Normalna vrijednost UCCR je <10 . Vrijednosti UCCR-a više su u pasa s PDH-om nego kod pasa s adrenokortikalnim tumorom. Ako je UCCR > 100 , vjerojatnost za PDH je 90% (ETTINGER i sur., 2017).

2.7.4. Kombinirani UCCR (urine corticoid-to-creatinine ratio) s LDDST-om (low-dose dexamethasone suppression test)

Kombinirani UCCR/LDDST provodi se tako da vlasnik kroz 2 uzastopna jutra prikupi 2 uzorka urina. Urin se prikuplja oko 8 ujutro svaki dan te se u ovim uzorcima odredi bazalni UCCR. Neposredno nakon što uspješno prikupi drugi uzorak, vlasnik administrira 0.01 mg/kg deksametazona peroralno psu. Nakon toga bi se mokraćni mjehur trebao isprazniti ili voljnim mokrenjem životinje ili kateterizacijom oko 14.00 sati taj dan. Treći se uzorak urina prikupi oko 16.00 sati, 8 sati nakon administracije deksametazona. Kod zdravih se životinja u trećem uzorku urina očekuje UCCR < 10 te $> 50\%$ -tna supresija u odnosu na srednju vrijednost bazalnog UCCR-a određenu iz prva dva uzorka urina (ETTINGER i sur., 2017).

2.8. Okultni ili atipični hiperadrenokorticism

Okultni ili atipični hiperadrenokorticism obilježen je prisutnošću kliničkih simptoma hiperadrenokortizma, unatoč tome što su rezultati dijagnostičkih testova (LDDST, ACTH stimulacijski test i UCCR) unutar referentnih vrijednosti (BEHREND i sur., 2013). Dio ovih pacijenata ima funkcionalne adrenokortikalne tumore koji izlučuju prekursore kortizola (17-OH-progesteron), dok je izlučivanje samog kortizola slabo. Kod takvih pacijenata nakon ACTH stimulacije primjećujemo vrlo slab porast razine kortizola, dok je razina progesterona nakon ACTH stimulacije visoka. Uzrok tomu je deplecija enzima koji su potrebni za produkciju kortizola. Zbog toga dolazi do otpuštanja prekursora kortizola, ali ne i samog kortizola. Unatoč tome, ovi pacijenti pokazuju kliničke znakove hiperkortizolizma. Razlog

tomu je perzistentno povećano lučenje kortizola koje rezultira povećanom ukupnom dnevnom koncentracijom kortizola. Osim toga, zbog povećane razine prekursora kortizola, dolazi do pomicanja kortizola s vezujućih proteina te porasta koncentracije tzv. slobodnog kortizola (BENNAIM i sur., 2019b). Za dijagnostiku ovog oblika bolesti može se mjeriti koncentracija 17-OH-progesterona prije te nakon ACTH stimulacijskog testa (ETTINGER i sur., 2017).

Postoji još nekoliko potencijalnih uzroka negativnih dijagnostičkih testova. Jedan od njih je da su „cut-off” vrijednosti dijagnostičkih testova previsoke te ih treba re-evaluirati. Moguće je i da neki od ovih pasa imaju rijetke oblike hiperadrenokorticisma kao što je HAC ovisan o hrani (BENNAIM i sur., 2019b).

2.9. Adrenalni funkcijski testovi za diferencijaciju

Služe za diferencijaciju PDH od AT-a, no ne smiju se izvoditi ako prethodno nismo dobili pozitivni rezultat na „screening testu”. Najčešće korišteni testovi za diferencijaciju su mjerenje endogenog ACTH-a, supresija deksametazonom (LDDST i HDDST) te supresija deksametazonom sa UCCR-om (BEHREND i sur., 2013). Bitno je razlikovati PDH od AT-a jer o tome ovisi odabir oblika terapije. Iako je kod oba oblika bolesti moguća samo medikamentozna terapija, kod adrenokortikalnih se tumora preporuča adenektomija, dok se kod PDH može primjenjivati radioterapija i/ili hipofizektomija (BENNAIM i sur., 2019b).

2.9.1 Mjerenje endogenog ACTH-a

Kod hiperadrenokorticisma ovisnog o hipofizi dolazi do pretjeranog lučenja ACTH od strane pituitarnog tumora, a kod adrenokortikalnog tumora visoka koncentracija kortizola kojeg producira sam tumor uzrokuje supresiju sekrecije ACTH (BENNAIM i sur., 2019b). Prema tome, kod PDH će koncentracija ACTH biti normalna ili povišena (>40 pg/mL tj. >8.8 pmol/L), dok će kod AT biti snižena ili nemjerljiva (<20 pg/mL tj. <4.4 pmol/L). Kod 20% pasa s hiperadrenokorticismom vrijednosti ACTH biti će u sivoj zoni (20-40 pg/mL tj. 4.4-8.8 pmol/L) te u tom slučaju test treba ponoviti ili odabrati druge diferencijacijske testove (ETTINGER i sur., 2017). Mjerenje endogenog ACTH tehnički je vrlo zahtjevno. Endogeni je ACTH vrlo labilan te ga plazmatske proteaze vrlo brzo razgrađuju. Krv treba sakupiti u

silikonom presvučenu staklenu ili plastičnu EDTA epruvetu koja je prethodno ohlađena u frižideru. Uzorak se mora unutar 15 minuta centrifugirati, a plazma se potom odvaja u plastične epruvete koje se stavljaju na zamrzavanje. Iste se u zamrznutom stanju šalju u laboratorij. Kod pasa s hiperadrenokorticismom ovisnim o hrani zabilježena je nemjerljiva ACTH koncentracija unatoč izostanku adrenokortikalnog tumora, dok je kod onih s ektopičnom sekrecijom ACTH zabilježena visoka ACTH koncentracija unatoč izostanku pituitarnog tumora (BENNAIM i sur., 2019b).

2.9.2. Supresija deksametazonom

2.9.2.1. Supresija niskom dozom deksametazona (LDDST)

Često nam je za postavljanje dijagnoze PDH, dovoljan već i LDDST. Kod 65% pasa s PDH javit će se jedan od tri kriterija: 4-satni kortizol < 40 nmol/L, 4-satni kortizol <50% bazalnog ili 8-satni kortizol <50% bazalnog, ali ≥ 27.6 nmol/L. Kod 35% pasa s PDH te kod svih pasa s adrenokortikalnim tumorom ne pojavljuje se ni jedan od prethodno navedenih kriterija. Kod tih je pasa prisutna rezistencija na deksametazon (ETTINGER i sur., 2017).

2.9.2.2. Supresija visokom dozom deksametazona (HDDST)

U zdravih pasa administracija deksametazona rezultira brзом supresijom sekrecije kortizola. Kod pacijenata s adrenokortikalnim tumorom koji uzrokuje hiperadrenokorticism aplikacija bilo koje doze deksametazona ne dovodi do supresije sekrecije kortizola. U 75% pacijenata s PDH, pri aplikaciji visoke doze deksametazona (0.1-1 mg/kg i.v. ili i.m.) dolazi do smanjenja koncentracije kortizola na <40 nmol/L. No, u 25% pacijenata s PDH ni pri aplikaciji visoke doze deksametazona neće doći do supresije sekrecije kortizola. Kod tih pacijenata, najvjerojatnije se radi o velikom pituitarnom tumoru. Prema tome, ako nakon uobičajenog „screening testa” prilikom kojeg smo ustanovili da se radi o pacijentu s hiperadrenokorticismom, provedemo test supresije visokom dozom deksametazona (HDDST) i ako pri tome dođe do supresije sekrecije kortizola, možemo zaključiti da se definitivno radi o pacijentu s hiperadrenokorticismom ovisnim o hipofizi (PDH). Ako supresija izostane, tj.

ako je prisutna rezistencija na deksametazon, nejasno je radi li se o pacijentu s hiperadrenokorticismom ovisnim o nadbubrežnoj žlijezdi ili o pacijentu s hiperadrenokorticismom ovisnim o hipofizi (BEHREND i sur., 2013). Treba imati na umu da će kod većine pasa s PDH kod kojih je došlo do supresije nakon aplikacije visoke doze deksametazona, doći i do supresije pri nižoj dozi deksametazona. Zato se kao prvi test izbora bira LDDST. Pri tom testu istovremeno možemo razlikovati zdrave pse od onih s hiperadrenokorticismom, ali i one koji imaju PDH od onih koji imaju AT. Ako nakon provedenog LDDST-a nismo saznali radi li se o PDH ili AT, bolje je izabrati druge diferencijacijske testove umjesto HDDST (ETTINGER i sur., 2017).

2.9.3. Kombinirani UCCR (urine corticoid-to-creatinine ratio) s HDDST-om (high-dose dexamethasone suppression test)

Ovaj se test sastoji u prikupljanju 2 uzastopna jutarnja urina kod kuće nakon čega se apliciraju 3 doze deksametazona peroralno (u razmacima od 6-8 sati, u dozi od 0.1 mg/kg). Treći se uzorak urina prikupi jutro nakon toga. Ako se UCCR u 3. uzorku urina smanjio na <50% srednje vrijednosti utvrđene u prva dva uzorka urina, tad možemo zaključiti da se radi o PDH. Izostanak supresije ne potvrđuje AT (BEHREND i sur., 2013).

2.10. Histopatološka dijagnostika i Utrechtski bodovni sustav

Diferencijacija između adrenokortikalnog adenoma i karcinoma temelji se na histopatologiji. No, sama histopatologija, ne govori puno o prognozi u ovih pacijenata. Stoga su SANDERS i sur., (2019), na uzorku od 50 pasa, osmislili novi histopatološki sustav bodovanja adrenokortikalnih tumora koji izlučuju kortizol. Utrechtski bodovni sustav osmišljen je kao spoj imunohistokemije i histopatologije.

SANDERS i sur., (2019) razmatrali su ukupno 20 histopatoloških parametra te Ki67 indeks proliferacije kako bi otkrili one parametre koji pokazuju značajnu povezanost sa vremenom preživljenja te kako bi pomoću istih mogli osmisliti formulu Utrechtskog bodovnog sustava. Iako su autori u početku raščlanili dijagnostičke mogućnosti na ukupno 21 parametar, samo su tri parametra pokazala značajnu povezanost s vremenom preživljenja:

prozirnost/vakuoliziranost citoplazme, prisutnost nekroze i Ki67 indeks proliferacije. Na temelju tih parametara izrađena je formula Utrechtskog bodovnog sustava (eng. Utrecht score, US): $1.12 \times \text{Ki67 IP} + 4.35$ ako više od 33% stanica ima prozirnú/vakuoliziranu citoplazmu + 3.18 ako je prisutna nekroza. Kako bi se ovaj sustav bodovanja pojednostavio, krajnja formula je bila: $\text{Ki67 IP} + 4$ (ako više od 33% stanica ima prozirnú/vakuoliziranu citoplazmu) + 3 (ako je prisutna nekroza).

Ki67 je biomarker tumorske proliferacije i apoptoze. To je nehistski, nuklearni protein koji je detektabilan u jezgri stanice tijekom cijele interfaze i tijekom mitoze. Prisutan je u G1 fazi interfaze, a povećava se u S i G2 fazi interfaze. Njegova je ekspresija najjača u M fazi, tj. tijekom mitoze, a neposredno nakon mitoze njegova ekspresija nestaje. U G0 fazi Ki67 nije detektabilan. Za razliku od Ki67 koji je detektabilan u različitim staničnim fazama, mitotski indeks (MI), koji se uobičajeno određuje u hematoksilin-eozin obojenim tkivima, odražava samo broj stanica u mitozu. U pozitivne stanice na Ki67 bojanje ubrajaju se samo one stanice kod kojih se obojala jezgra. Njihov je broj značajno manji u benignih tumora, a prisutnost velikog broja pozitivnih stanica korelira s metastazama, lošijom prognozom i kraćim preživljavanjem. Kod mamarnih tumora pasa utvrđeno je da je ekspresija Ki67 najveća kod velikih tumora, tumora koji su zahvaćeni upalom, ulceriranih tumora te tumora koji invadiraju okolno tkivo s metastazama u limfne čvorove. Ekspresija Ki67 pozitivnih stanica u metastazama zahvaćenim limfnim čvorovima ima pozitivnu korelaciju s ekspresijom Ki67 pozitivnih stanica u primarnom tumoru (KASZAK i sur., 2018). Broj pozitivnih stanica na Ki67 indeks proliferacije trebalo bi brojati u tzv. „hot-spot” područjima, odnosno područjima gdje ima najviše Ki67 pozitivnih stanica. Ova bi područja trebalo slikati, izbrojati 1000 stanica te izraziti broj pozitivnih stanica na 1000 stanica. Idealno bi bilo koristiti ImageJ ili neki slični program za brojanje pozitivnih i negativnih stanica (SANDERS i sur., 2019).

Obzirom da agresivne tumore prati hipoksija tkiva i pojačana proliferacija stanica, jasno je zašto su prisutnost nekroza i Ki67 indeks proliferacije bitni prognostički čimbenici. Manje je jasno zašto je prozirnost/vakuoliziranost citoplazme povezana s prognozom. Smatra se da takav izgled citoplazme sugerira prisutnost intra-citoplazmatskih kapljica lipida u kojima je pohranjen kolesterol. Kako je kolesterol prekursor steroidnih hormona, veći postotak stanica s prozirnóm/vakuoliziranóm citoplazmom mogao bi biti povezan s većom proizvodnjom kortizola ili njegovih prekursora (SANDERS i sur., 2019).

Za svakog je psa prema navedenoj formuli izračunat pripadajući zbroj bodova. Pomoću donje „cut-off” koja je iznosila 6 i gornje „cut-off” vrijednosti koja je iznosila 11, nastale su 3 grupe: prva grupa: zbroj bodova US < 6; druga grupa: zbroj bodova US \geq 6 do < 11; te treća grupa: zbroj bodova US \geq 11 (SANDERS i sur., 2019).

Nakon dugoročnog praćenja pacijenata, izračunato je prosječno vrijeme preživljenja. Ono je bilo izraženo kao razdoblje od kirurškog zahvata (adrenalektomije) do eutanazije zbog povrata HAC-a. Povrat HAC-a se javlja radi nastanka metastaza tumora ili ponovnog rasta primarnog tumora. Da se radi o povratu HAC-a smatralo se u svim slučajevima kod kojih je došlo ili do ponovnog javljanja tipičnih simptoma ove bolesti ili ako je potvrđena prisutnost metastaza. Svi psi uginuli zbog razloga neovisnih o prisustvu ove bolesti, oni psi čije kliničko praćenje nakon kirurškog zahvata nije bilo moguće te oni koji su na kraju ovog istraživanja i dalje bili živi, su bili cenzurirani, a kao datum cenzuriranja uzet je onaj datum na koji je zadnje bilo poznato da je životinja još živa (SANDERS i sur., 2019). Prosječno vrijeme preživljenja za cijelu pretraživanu skupinu iznosilo je 54.7 mjeseci. Budući da je većina pacijenata u prvoj grupi bila živa nije se moglo odrediti vrijeme preživljenja, za drugu grupu ono je iznosilo 51.5 mjeseci, a za treću grupu je iznosilo 14.4 mjeseca (SANDERS i sur., 2019).

Prema tome, viši zbroj pri Utrechtskom bodovnom sustavu povezan je s kraćim vremenom preživljavanja (SANDERS i sur., 2019).

Također, adrenokortikalni tumori s rezultatom < 6 imaju nisku vjerojatnost povrata tumora, AT s rezultatom \geq 6 do < 11 imaju umjeren rizik za povrat tumora, a AT s rezultatom \geq 11 imaju visok rizik za povrat tumora (SANDERS i sur., 2019).

U navedenom je istraživanju razmatran i utjecaj kliničkih parametara na vrijeme preživljenja. Klinički su parametri bili podijeljeni u 3 skupine: parametri vezani uz psa, parametri vezani uz tumor i parametri vezani uz kirurški zahvat. Od parametara vezanih uz psa promatrani su spol, kastracijski status, tjelesna masa, starost u vrijeme kirurškog zahvata te preoperativno tretiranje hiperkortizolizma. Parametri vezani uz tumor bili su lokacija tumora (lijeva ili desna), invazija vene utvrđena tijekom slikovne dijagnostike ili kirurškog zahvata te sam promjer tumora. Promjer tumora nije uključivao normalno, zdravo tkivo, a mjerenje tumora obavljeno je tijekom slikovne dijagnostike (ultrazvuk, CT) i/ili nakon samog kirurškog

zahvata. Parametri vezani uz kirurški zahvat bili su trajanje kirurškog zahvata te evidencija ruptur kapsule. Od svih analiziranih kliničkih parametara, samo je veličina (promjer) tumora bila povezana s vremenom preživljavanja. Utvrđena je značajna razlika u preživljavanju između pasa kod kojih je adrenokortikalni tumor < 3 cm i onih kod kojih je bio ≥ 3 cm. Prosječno preživljavanje kod pasa s AT < 3 cm bilo je 54.7 mjeseci, dok je kod pasa s AT ≥ 3 cm bilo 24.2 mjeseca. Daljnjom multivarijatnom analizom utvrđeno je da sam promjer tumora ne može biti samostalni čimbenik za predviđanje vremena preživljenja (SANDERS i sur., 2019).

2.11. Liječenje hiperadrenokorticisma

2.11.1. Liječenje hiperadrenokorticisma ovisnog o ACTH

Kod PDH je moguće kirurško liječenje (hipofizektomija) sa ili bez radioterapije, ali i medikamentozno liječenje trilostanom, mitotanom i ketokonazolom. Trilostan i ketokonazol inhibiraju sintezu adrenokortikalnih hormona, dok mitotan uzrokuje parcijalnu ili potpunu nekrozu adrenalnog korteksa. Trilostan i mitotan snižavaju koncentraciju kortizola u plazmi, a uzrokuju povećano izlučivanje ACTH što može dovesti do daljnjeg rasta tumora (ETTINGER i sur., 2017).

2.11.1.1. Medikamentozno liječenje PDH trilostanom

Trilostan je kompetitivni inhibitor enzima 3-beta-hidroksisteroid dehidrogenaze. Ovaj enzim pretvara pregnenolon u progesteron, bitni prekursor kortizola i aldosterona. Inhibicijom ovog enzima, dolazi do supresije produkcije kortizola i aldosterona. Nakon jednokratne aplikacije, učinak lijeka traje 12 sati. Inicijalna doza trilostana trebala bi biti 0.5-1 mg/kg p.o. svakih 12 sati. Već unutar 7-10 dana moguće je primjetiti poboljšanje kliničkih simptoma, osobito poliurije i polidipsije. Za smanjenje polifagije treba i do nekoliko tjedana, a za povlačenje dermatoloških simptoma i do nekoliko mjeseci. U početku je moguće i prividno pogoršanje dermatološke kliničke slike zbog ljuštenja mrtve kože te ispadanja odumrle dlake. Dozu lijeka

prilagođavamo ovisno o rezultatima redovitih ACTH stimulacijskih testova (ETTINGER i sur., 2017).

Monitoring primjene trilostana mora se redovito provoditi kako bi se izbjegle neželjene nuspojave te prilagodila doza lijeka. Prva bi kontrola trebala biti 10-15 dana nakon početka terapije, druga kontrola za mjesec dana, a treća za tri mjeseca. Nakon toga bi se redovite kontrole trebale provoditi svakih 3-6 mjeseci. Pri svakoj kontroli treba napraviti kompletnu krvnu sliku, biokemijski profil i elektrolite te ACTH stimulacijski test. ACTH stimulacijski test trebalo bi napraviti 2-4 sata nakon administracije trilostana. Rezultati ACTH stimulacijskog testa smatraju se prihvatljivima ako je koncentracija stimuliranog kortizola 41-152 nmol/L. Pri prvoj se kontroli doza trilostana ne smije mijenjati, čak i u slučaju da se klinički simptomi nisu poboljšali i unatoč tome što koncentracija stimuliranog kortizola pri prvoj kontroli može biti iznad 152 nmol/L. Doza trilostana smije se povećavati tek pri idućim kontrolama. U slučaju da je pri ACTH stimulaciji koncentracija stimuliranog kortizola manja od 41 nmol/L s administracijom trilostana mora se prekinuti bar na 5-7 dana. Pri ponovnom uvođenju trilostana, doza mora biti 25-50% manja. Ako je koncentracija kortizola 2-4 tjedna kasnije još uvijek niska, primjenu trilostana treba prekinuti, a ACTH stimulacijski test provoditi svakih nekoliko mjeseci ili pri svakom idućem zapažanju povratka simptoma hiperkortizolizma. Trilostan se smije ponovno uvoditi samo u slučaju ponovne pojave simptoma uz istovremeni nalaz povišene koncentracije kortizola prilikom ACTH stimulacijskog testa (ETTINGER i sur., 2017).

Pri monitoringu primjene trilostana može nam koristiti i specifična težina mokraće. Ako je specifična težina mokraće <1.020 te je PU/PD i dalje prisutan, doza davanja trilostana trebala bi se povećati (ETTINGER i sur., 2017).

Nuspojave trilostana su rijetke i većina pasa ovaj lijek dobro tolerira. No, moguća je pojava letargije, gubitka apetita te težih nuspojava kao što su depresija, anoreksija, povraćanje, proljev, tremor, gubitak težine i eventualno nastup smrti. Pri pojavi ovih simptoma s primjenom trilostana mora se odmah prestati. Pri primjeni previsokih doza trilostana ili pri predoziranju moguća je pojava simptoma hipokortizolizma te adrenokortikalne nekroze. Pri sumnji na hipokortizolizam, provode se ACTH stimulacijski test, analiza biokemijskog profila te mjerenje koncentracije elektrolita u krvi. Pojavu hipokortizolizma potvrđuje koncentracija stimuliranog kortizola manja od 41 nmol/L. Ako je uz to koncentracija elektrolita normalna, s

primjenom trilostana se prestaje, a po potrebi se daju glukokortikoidi. ACTH stimulacijski test ponavlja se za 2-4 tjedna. Trilostan se smije ponovno uvoditi samo u slučaju nalaza koncentracije stimuliranog kortizola >276 nmol/L te u slučaju ponovne pojave simptoma hiperkortizolizma. Pri ponovnom uvođenju trilostana, doza mora biti 25-50% manja. Ako je koncentracija kortizola 2-4 tjedna kasnije još uvijek niska, najvjerojatnije se radi o adrenokortikalnoj nekrozi. Primjenu trilostana tada treba dugoročno prekinuti, a ACTH stimulacijski test provoditi svakih nekoliko mjeseci ili pri svakom idućem zapažanju povratka simptoma hiperkortizolizma. U slučaju da je pri prvotnoj pojavi hipokortizolizma koncentracija elektrolita također promijenjena (hiperkalijemija i/ili hiponatrijemija), s primjenom se trilostana prestaje na razdoblje od minimalno mjesec dana te se pristupa liječenju Adisonijanske krize. Nakon toga se kontrolni ACTH stimulacijski testovi provode svakih 3-6 mjeseci te se ovisno o njima odlučuje o prekidu terapije hipoadrenokorticismom ili o eventualnom ponovnom uvođenju trilostana (ETTINGER i sur., 2017).

2.11.1.2. Medikamentozno liječenje PDH mitotanom

Mitotan ima adrenokortikolitičko djelovanje te polučuje direktni citotoksični učinak na koru nadbubrežne žlijezde. To rezultira selektivnom i progresivnom nekrozom *zona fasciculata* i *zona reticularis*. Iako je *zona glomerulosa* manje osjetljiva na djelovanje ovog lijeka, pri visokim dozama mitotan uzrokuje nekrozu i ovog dijela kore nadbubrežnih žlijezda. Mitotan je topiv u mastima te se stoga terapija uvijek daje zajedno s obrokom. Pri primjeni ovog lijeka koriste se dva protokola: standardni i neselektivni protokol. Standardni protokol uzrokuje nekrozu *zona fasciculata* i *zona reticularis* uz očuvanje *zona glomerulosa*, a neselektivni protokol dovodi to nekroze cijele kore obje nadbubrežne žlijezde (ETTINGER i sur., 2017).

Pri standardnom protokolu koristi se u početnoj fazi indukcije viša doza mitotana, tzv „loading doza“ od 30-50 mg/kg/dan koja se primjenjuje peroralno, u trajanju do 10 dana. Kod srednjih i velikih pasmina pasa ukupna se dnevna doza može podijeliti na dvije doze. Istovremeno se daje i prednizon ili prednizolon u dozi od 0.15-0.25 mg/kg/dan (maksimalno 5 mg/dan/psu) kako bi se kompenzirali negativni učinci brzog opadanja serumske koncentracije kortizola. U slučaju pojave simptoma koji ukazuju na hipoadrenokorticismom, indukcijsko razdoblje od 10 dana treba se prekinuti. Tada se pristupa aplikaciji glukokortikoida, najčešće prednizona u dozi od 0.2-0.5 mg/kg/dan peroralno. Kroz čitavo početno razdoblje liječenja

mitotanom, vlasnici trebaju pomno motriti apetit, raspoloženje te količinu vodu koju pas popije. Gubitak apetita prva je nuspojava primjene ovog lijeka. U slučaju da pas ima smanjen apetit te posljedično tome obrok jede sporije nego obično ili ga uopće ne pojede, tada vlasnik ne smije više davati mitotan dok se ne konzultira s veterinarom. Nakon induksijske faze pristupa se kliničkom pregledu s provođenjem ACTH stimulacijskog testa. Ako su u induksijskom razdoblju uz mitotan korišteni i glukokortikoidi, ne smije ih se davati to jutro na dan kada će se provesti ACTH stimulacijski test. Smiju se davati tek nakon provedenog ACTH stimulacijskog testa. Cilj terapije mitotanom je relativni, ali ne i potpuni hipoadrenokorticism. Željena koncentracija bazalnog kortizola je 25-125 nmol/L, a nakon stimulacije očekuje se minimalan porast ili izostanak porasta koncentracije kortizola (<125 nmol/L). U slučaju da je stimulirani kortizol <25 nmol/L s primjenom mitotana se prestaje, a daju se glukokortikoidi sve dok koncentracija kortizola ne bude 25-125 nmol/L. Kod pasa kod kojih je stimulirani kortizol >125 nmol/L s primjenom mitotana se nastavlja dokle god koncentracija kortizola nije između 25 i 125 nmol/L. Po završenoj fazi indukcije, primjenjuje se doza održavanja od 50 mg/kg/tjedan, podijeljena u dvije do četiri doze. Tijekom primjene doze održavanja nije potrebna istovremena primjena glukokortikoida, osim u slučaju kada se očekuje stresni događaj. ACTH stimulacijski test treba se provoditi svakih 3-6 mjeseci tijekom faze održavanja, a kasnije svakih 6 mjeseci, kako bi se spriječila ponovna pojava simptoma hiperadrenokorticisma. Kod čak 50% pasa tretiranih mitotanom, unutar prvih 12 mjeseci dolazi do ponovne pojave simptoma HAC-a. Ako prilikom kontrolnih ACTH stimulacijskih testova zabilježimo bazalnu i stimuliranu koncentraciju kortizola veću od 125 nmol/L, mitotan treba ponovno uvesti u dozi od 30-50 mg/kg/dan u trajanju od 5-7 dana (ili duže ako je to potrebno). Nakon što dođe do ponovnog pada koncentracija kortizola u ciljni interval, uobičajena se doza održavanja mora povećati za 50% kako bi se spriječio ponovni povratak znakova hiperadrenokorticisma. Najteža posljedica primjene mitotana je potpuna destrukcija obiju kora nadbubrežnih žlijezda koji dovodi do glukokortikoidne i mineralokortikoidne deficijencije tj. do Addisonove bolesti. Kod standardnog se protokola jatrogena Addisonova bolest javlja u manje od 5% slučajeva. Ako nakon pojave simptoma hipoadrenokorticisma apliciramo glukokortikoide te pri tome ne dođe do pozitivnog odgovora unutar 2-3 sata, možemo zaključiti da se radi o jatrogenom Addisonu. Tada se s aplikacijom mitotana zauvijek mora prestati, a glukokortikoidi i mineralokortikoidi se do kraja života moraju nadoknađivati (ETTINGER i sur., 2017).

Neselektivni protokol dovodi do potpune destrukcije adrenalnog korteksa, uključujući i *zona glomerulosa*. Sastoji se u peroralnoj primjeni mitotana, u dozi od 50-75 mg/kg/dan, u trajanju do 25 dana. Dnevna se doza najčešće dijeli u dvije ili tri manje doze. Trećeg dana davanja mitotana, uvodi se i doživotna suplementacija glukokortikoida (prednizon u dozi od 0.2 mg/kg ili hidrokortizon u dozi od 1-2 mg/kg/dan) i mineralokortikoida (fludrokortizon u dozi od 0.01 mg/kg peroralno svakih 12 sati). Doze fludrokortizona te glukokortikoida postepeno se smanjuju i prilagođavaju ovisno o biokemijskom nalazu. Ponovni povratak bolesti u pasa tretiranih neselektivnim protokolom je 30-40%, dok je ovaj postotak kod standardnog protokola značajno viši te iznosi 50-60% (ETTINGER i sur., 2017).

2.11.1.3. Medikamentozno liječenje PDH ketokonazolom

Ketokonazol pripada skupini antimikotika, a inhibira sintezu glukokortikoida i androgena. Učinkovito smanjuje koncentraciju glukokortikoida, no njegov utjecaj na mineralokortikoide je neznatan. Kod nekih se pasa ovaj lijek pokazao kao dobar izbor, no kod trećine do polovine pasa s ovom bolesti primjena ovog lijeka nema učinka. Početna doza je 5 mg/kg peroralno svakih 12 sati u trajanju od 7 dana. Ako pas ovaj lijek dobro tolerira, doza se povećava na 10 mg/kg peroralno svakih 12 sati u trajanju od 14 dana. Po isteku prvih 14 dana provodi se ACTH stimulacijski test kod kojeg se očekuje nalaz bazalne i stimulirane koncentracije kortizola unutar referentnog intervala. Ako je koncentracija kortizola i dalje iznad referentnih vrijednosti, doza ketokonazola se povećava na 15 mg/kg peroralno svakih 12 sati u trajanju od 14 dana, te se onda ponovno provodi ACTH stimulacijski test. Za adekvatan terapijski učinak, kod većine je pasa potrebno davati 30 mg/kg ketokonazola dnevno. Terapija ketokonazolom je doživotna (ETTINGER i sur., 2017).

2.11.2. Liječenje hiperadrenokorticisma neovisnog o ACTH

Kao i kod PDH, moguće je kirurško liječenje (adrenalektomija) te medikamentozno liječenje trilostanom ili mitotanom. Vrijeme preživljavanja kod pacijenata koji su tretirani kirurški nije značajno duže od onih koji su tretirani samo trilostanom ili mitotanom. Prosječno vrijeme preživljavanja kod pasa koji su podvrgnuti adrenalektomiji iznosi 2 do 4 godine. Psi tretirani

trilostanom preživljavaju 11.5-14 mjeseci, a psi tretirani mitotanom 3-15.6 mjeseci (ETTINGER i sur., 2017).

2.11.2.1. Adrenalektomija

Kod pasa s adrenokortikalnim tumorom preporuča se adrenalektomija uz preoperativno tretiranje trilostanom. Preoperativno se trilostan daje u trajanju od 1-2 mjeseca u dozi od 0.2-1.0 mg/kg peroralno svakih 12 sati. Preoperativna će primjena trilostana rezultirati povlačenjem kliničkih znakova i laboratorijskih abnormalnosti. Osim preoperativne terapije trilostanom, kod svakog bi psa koji će biti podvrgnut adrenalektomiji, neposredno prije zahvata trebala biti napravljena kompletna krvna slika, biokemijski profil, rendgen toraksa te po mogućnosti ponovljena ultrazvučna pretraga abdomena. Ultrazvučnom pretragom se brzo i bez uporabe sedacije/anestezije može utvrditi prisutnost metastaza te o potencijalna invazija *v. cava caudalis* (ETTINGER i sur., 2017).

Adrenalni tumori, uključujući i feokromocitome, invadiraju *v. cava caudalis* u 9.5-46% slučajeva. Kod feokromocitoma je invazija *v. cava caudalis* češća. Tumore koji invadiraju *v. cava caudalis* možemo nadalje podijeliti u 2 skupine: tumori s lokalnom invazijom (tumorski tromb koji se širi kaudalno od jetrenog hilusa) te tumori s opsežnom invazijom (tumorski tromb koji se širi kranijalno od jetrenog hilusa)(BARRERA i sur., 2013). Veći postotak perioperativne smrtnosti prilikom adrenalektomije utvrđen je u tumora koji invadiraju *v. cava caudalis* u odnosu na one koji ju ne invadiraju. Dodatno, perioperativna je smrtnost 4 puta češća kod tumora s opsežnom invazijom u odnosu na one s lokalnom invazijom. Prema tome, zahvaćenost *v. cava caudalis* značajno utječe na kratkotrajno preživljavanje (<14 dana nakon kirurškog zahvata). Međutim, zahvaćenost *v. cave caudalis* nema nikakvog utjecaja na dugotrajno preživljavanje (>14 dana nakon kirurškog zahvata). (BARRERA i sur., 2013.)

Budući da je druga, „zdrava” nadbubrežna žlijezda atrofirala kod ovih pacijenata, intraoperativno i postoperativno treba nadoknađivati glukokortikoide. Već se intraoperativno započinje s trajnom infuzijom deksametazona, a ukupno se daje 0.05-0.1 mg/kg deksametazona kroz 6 sati u kontinuiranoj infuziji. Postoperativno se deksametazon daje 2 do 3 puta dnevno nakon čega se prelazi na peroralnu terapiju u dozi od 0.5 mg/kg svakih 12 sati kroz 3 dana te se onda postepeno kroz 2-4 tjedna smanjuje doza na 0.2 mg/kg/dan. Alternativa

deksametazonu je hidrokortizon koji se intraoperativno daje u dozi 4-5 mg/kg intravenski, a postoperativno u dozi od 1 mg/kg intravenski svakih 6 sati. Hidrokortizon ima glukokortikoidno i mineralokortikoidno djelovanje te je stoga izvrsna zamjena za deksametazon. Jutro nakon kirurškog zahvata tj. 8 sati nakon posljednjeg davanja deksametazona, preporučeno je napraviti ACTH stimulacijski test kako bi se odredilo je li uspješno provedeno potpuno uklanjanje tumora. Nalaz niske koncentracije kortizola prije i nakon aplikacije ACTH potvrđuje potpuno uklanjanje tumora. Postoperativno se ponekad javljaju poremećaji elektrolita (hiperkalijemija i hiponatrijemija), te u terapiju treba uključiti i davanje mineralokortikoida. U tu svrhu se najčešće koriste fludrokortizon u dozi od 0.01-0.02 mg/kg svakih 12 sati peroralno ili DOCP (deoksikortikosteron pivalat) u dozi od 2.2 mg/kg svakih 12 sati subkutano (ETTINGER i sur., 2017).

Ukupna perioperativna smrtnost kod pacijenata s adrenalnim tumorima koji su podvrgnuti adrenalektomiji iznosi oko 8%, a smrtnost unutar prvih 14 dana nakon operacije iznosi 25%. Kod tumora koji invadiraju *v. cava caudalis*, smrtnost unutar prvih 14 dana iznosi 72%. (BARRERA i sur., 2013).

Adrenalektomiju ponekad prati postoperativni pankreatitis koji nastaje zbog manipulacije pankreasom ili epizoda hipotenzije tijekom zahvata. Iako se hipotenzija češće javlja za vrijeme operacije adrenalnih tumora koji invadiraju *v. cava caudalis*, učestalost pankreatitisa kod tumora s invazijom *v. cava caudalis* nije veća od one kod tumora koji ju ne invadiraju. Desnostrana adrenalektomija zahtijeva više intraoperativne manipulacije pankreasom. Ostale perioperativne komplikacije su diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) koja se češće javlja kod feokromocitoma zbog otpuštanja kateholamina. DIK je češći u pacijenata koji su primili intraoperativnu transfuziju pune krvi ili krvnih produkata. Hipoksemija kao postoperativna komplikacija najčešće nastaje zbog plućne tromboembolije, hipoventilacije, aspiracijske pneumonije ili nepovezanih patoloških promjena na plućima. Plućnu se tromboemboliju može prevenirati primjenom konstantne infuzije heparina na početku samog kirurškog zahvata kako bi se produžilo aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. Kod pasa s feokromocitomima, preoperativno davanje fenoksibenzamina pokazalo je zaštitni učinak sa smanjenjem perioperativne smrtnosti sa čak 48% na 13% (BARRERA i sur., 2013).

2.11.2.2. Medikamentozno liječenje AT trilostanom

Kod određenog broja pasa s ovim oblikom bolesti vlasnici se ipak odluče samo za medikamentoznu terapiju trilostanom. Najčešće je to slučaj kod pasa koji imaju neoperabilne tumore i metastaze te na temelju te činjenice vlasnici ne žele izlagati svog psa kirurškom zahvatu (ETTINGER i sur., 2017).

2.11.2.3. Medikamentozno liječenje AT mitotanom

Pse s adrenokortikalnim tumorom se može liječiti standardnim protokolom mitotanom koji se primjenjuje kod pasa s PDH, no kod ovog se oblika bolesti primjenjuje početna dnevna doza 50-75 mg/kg peroralno. Za čitavo vrijeme davanja mitotana, daje se i prednizon ili prednizolon u dozi od 0.2 mg/kg/dan kako bi se spriječio nastanak hipoadrenokorticisma. Svakih 10-14 dana ponavlja se ACTH stimulacijski test kako bi se procijenio odgovor tumorskog tkiva na mitotan. Početna se doza može postepeno povećavati dokle god ne zabilježimo zadovoljavajuće rezultate ACTH stimulacijskog testa (zadovoljavajuće koncentracije kortizola). Uobičajeno je da se kod pacijenata s AT postižu i do 10 puta veće doze nego kod pasa s PDH. Nakon postizanja zadovoljavajuće koncentracije kortizola, prelazi se na dozu održavanja mitotana. Ona kod PDH iznosi 75-100 mg/kg jednom tjedno, a kod AT doza održavanja često prelazi 100 mg/kg/tjedan. Nuspojave primjene mitotana javljaju se u 60% pacijenata. To su anoreksija, slabost, letargija, povraćanje i proljev. Pri pojavi nuspojava, mora se prestati s administracijom mitotana te pri ponovnom uvođenju doza mora biti 25-50% manja (ETTINGER i sur., 2017).

3. MATERIJALI I METODE

Pregledom arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te pregledom arhivskih podataka Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u vremenskom periodu od 1. ožujka 2013. do 1. siječnja 2022. izdvojeni su svi psi kod kojih je dijagnosticiran HAC uzrokovan adrenokortikalnim tumorom te potom učinjena unilateralna adrenalektomija sa slanjem uzoraka zahvaćene nadbubrežne žlijezde na histopatološku pretragu. U ovo je istraživanje uključeno ukupno 6 pasa. Kod svih 6 pasa klinička je dijagnoza postavljena na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a adrenalektomija obavljena na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci od 5 pasa po završenoj adrenalektomiji poslani su na Zavod za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta, a uzorak od 1 psa poslan je u Laboklin u Njemačku. Za taj je uzorak u svrhu ovog diplomskog rada zatraženo vraćanje parafinskog bloka u Republiku Hrvatsku te je obojan i analiziran na Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Kriteriji prema kojima su odabrani pacijenti koji su bili uključeni u ovaj diplomski rad, prikazani su u tablici 3. Iz kartica pacijenata izdvojeni su klinički podaci relevantni za ovo istraživanje. Kategorizacija kliničkih parametara preuzeta je prema onoj u istraživanju SANDERS i sur., (2019) te su oni podijeljeni u parametre vezane uz psa i parametre vezane uz tumor. Zbog nedostatka podataka, parametri vezani uz kirurški zahvat nisu razmatrani. Parametri vezani uz psa bili su: pasmina, spol, kastracijski status, tjelesna masa, starost u vrijeme kirurškog zahvata i preoperativno tretiranje HAC-a. Zbog nedostatka podataka parametri vezani uz tumor modificirani su u odnosu na referentni rad te su uključivali: lokaciju tumora (lijeva ili desna), invaziju *v. cava caudalis* te debljinu zahvaćene nadbubrežne žlijezde utvrđenu tijekom slikovne dijagnostike ili za vrijeme kirurškog zahvata. U referentnom je radu umjesto zadnje navedenog parametra (debljina nadbubrežne žlijezde) kao parametar korišten promjer samog tumora. Podatak o veličini samog tumora kod naših pacijenata nije bio poznat. Ovaj je parametar stoga zamijenjen debljinom zahvaćene nadbubrežne žlijezde.

Tablica 3. Ulazni kriteriji

Kriterij	Pojašnjenje
Klinička slika koja ukazuje na prisustvo hiperadrenokorticisma	Prisutnost barem 1 tipičnog kliničkog simptoma hiperadrenokorticisma
Nalaz funkcijskih adrenalnih testova pozitivan na hiperadrenokorticismam	LDDST/ACTHST/UCCR
Ultrazvučni nalaz sugestivnan na hiperadrenokorticismam uzrokovan adrenokortikalnim tumorom	Asimetrija nadbubrežnih žlijezda s kontralateralnom atrofijom
Učinjena unilateralna adenektomija	Uz slanje uzoraka na Zavod za veterinarsku patologiju/Laboklin
Nalaz histopatološke pretrage koji potvrđuje adrenokortikalni tumor	Adrenokortikalni adenom/Adrenokortikalni karcinom

Za svakog su psa iz kartica izvađeni podaci o prisutnosti kliničkih simptoma hiperadrenokorticismam (PUPD - poliurija/polidipsija, alopecija, *calcinosis cutis*, pretilost, hipertenzija, abdominalna distenzija, dahtanje, hepatomegalija, polifagija, infekcija urinarnog trakta te slabost mišićja).

Svim je pacijentima prilikom pregleda uzeta krv za hematološke (ABC Automated Hematology Analyser, Horiba Diagnostics, Montpellier, Francuska) i biokemijske pretrage (Olympus AU 640 Analyser, Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Njemačka). Sve su rutinske analize krvi provedene u laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti. Unutar kompletne krvne slike razmatrala se prisutnost ili odsutnost komponenti tipičnog stresnog leukograma koji prati hiperadrenokorticismam (neutrofilija, monocitoza, eozinopenija i limfopenija) te prisutnost/odsutnost blage eritrocitoze i trombocitoze. Pri analizi biokemijskog profila posebna pažnja usmjerena na koncentracije ALP-a, ALT-a, kolesterola, triglicerida, glukoze, ureje, kreatinina i fosfora. Kod 4 od 6 pacijenata provedena je i analiza urina pri kojoj je posebna pažnja usmjerena na specifičnu težinu mokraće, prisutnost proteinurije te eventualnu bakterijuriju kao dokaz infekcije mokraćnog sustava.

Kod svih je pasa napravljena ultrazvučna pretraga abdomena pomoću ultrazvučnog aparata Esaote MyLab™ 40. Pregledani su svi organi trbušne šupljine, a za potrebe ovog diplomskog

rada osobita je pažnja posvećena ultrazvučnom nalazu pri pregledu nadbubrežnih žlijezda, jetre i žučnog mjehura.

Za svakog je pacijenta zabilježena prisutnost ili odsutnost najčešćih komorbiditeta koji prate hiperadrenokorticism: *diabetes mellitus*, mukokela žučnog mjehura, pankreatitis, urolitijaza i/ili infekcije u urinarnom traktu. Zabilježena je i prisutnost ostalih komorbiditeta.

Uzorci nadbubrežnih žlijezda uklonjenih unilateralnom adrenalektomijom fiksirani su u 4% formalinu u trajanju od 24 do 48 sati. Nakon što su uklopljeni u parafin, narezani su na debljinu od 4 µm pomoću mikrotoma, a onda su preneseni na predmetnice. Jedna je sekcija tkiva obojana hematoksilin-eozin (HE) metodom, a druga imunohistokemijskim bojanjem za detekciju Ki67 pozitivnih stanica (Slika 4). Preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom Nikon 2000 Eclipse uz pomoć objektivna 4x, 10x, 20x i 40x. Na preparatima obojenim hematoksilin-eozinom promatrana je prisutnost/odsutnost nekroze te je procijenjeno ima li više od 33% stanica tumora vakuoliziranu/prozirnu citoplazmu. Na svakoj sekciji tkiva koja je obojena imunohistokemijskim bojanjem Ki67 prvo je pronađeno tzv. „hot-spot” mjesto, odnosno mjesto na preparatu s najviše pozitivnih stanica. Pod mikroskopskim povećanjem od 40x, navedeno mjesto je slikano pomoću mobilnog uređaja te je izbrojano ukupno 1000 stanica. Ukupan broj stanica pozitivnih na Ki67 izražen je u postotku u odnosu na tih 1000 stanica. Pozitivnim stanicama su se smatrale samo one koje imaju smeđe-žučkasto obojenu jezgru. (Slika 24)



Slika 4. Uzorci adrenokortikalnih tumora obojani hematoksilin-eozinom (lijevo) i imunohistokemijskim bojanjem za detekciju Ki67 pozitivnih stanica (desno).

Nakon histopatološke analize, za svakog je pacijenta izračunat tzv. Utrechtski bodovni sustav prema formuli: Utrecht score = Ki67 IP + 4 (ako više od 33% stanica ima prozirnu/vakuoliziranu citoplazmu) + 3 (ako je prisutna nekroza). Pacijenti su ovisno o rezultatima bodovanja podijeljeni u 3 grupe: ukupni zbroj < 6, ukupni zbroj ≥ 6 do < 11 te ukupni zbroj ≥ 11 te je ovisno o tome procijenjeno njihovo prosječno vrijeme preživljenja i mogućnost povrata tumora prema uzoru na referentni rad.

Konačno, obzirom da se radi o retrospektivnom istraživanju, od vlasnika ili iz kartica prikupljeni su podaci o stvarnom vremenu preživljenja te je ono uspoređeno s procijenjenim vremenom preživljenja na temelju Utrechtskog bodovnog sustava.

3.1. Statistička obrada

Statistička analiza podataka napravljena je u programu R-studio. Korištena je univarijatna analiza tj. „Cox-ov model proporcionalnog rizika”. Za obradu podataka korišten je i računalni program Microsoft Office Excel©.

4. REZULTATI

U vremenskom razdoblju od 01. ožujka 2013. do 01. siječnja 2022. ukupno je 6 pasa zadovoljilo sve ulazne kriterije iz tablice 3.

4.1. Struktura istraživane populacije

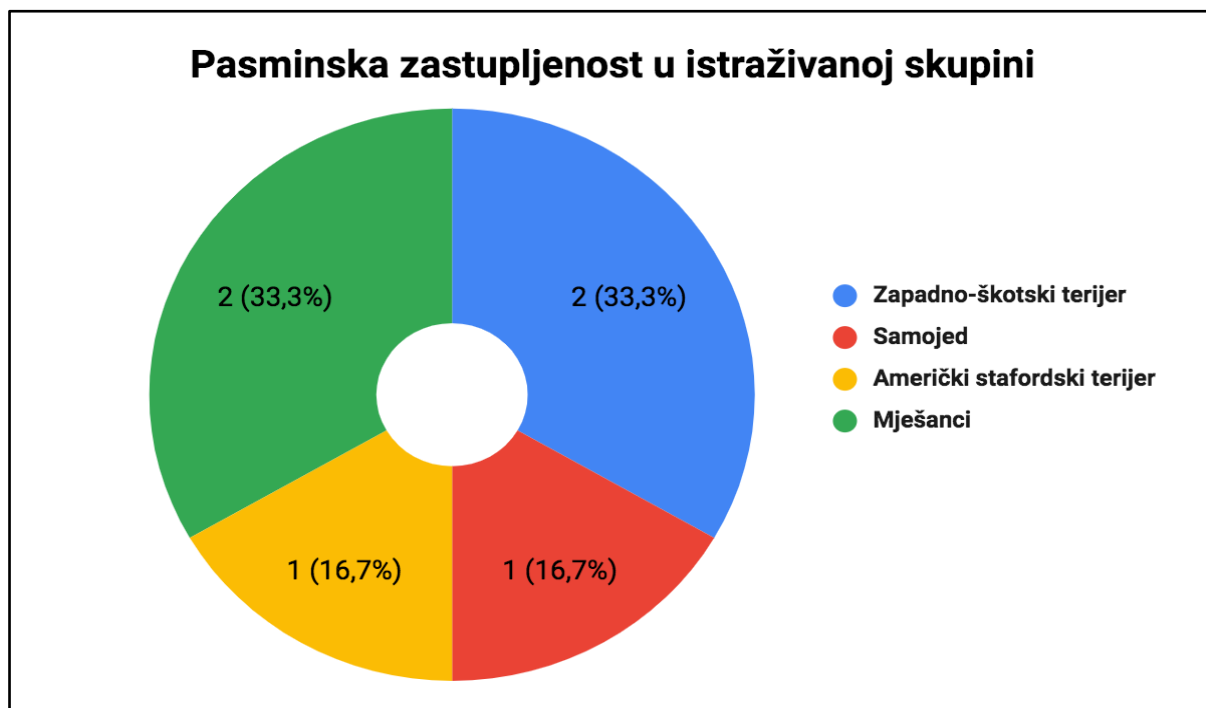
U istraživanje su bile uključene 3 pasmine i mješanci. Najbrojniji su bili zapadno-škotski terijeri (n=2) i mješanci (n=2) s učešćem od 33,3%. Pasmina samojed (n=1) i pasmina američki stafordski terijer (n=1) bile su zastupljene s 16,7%. (Slika 5.)

Obzirom na spol ženke su zastupljene s 83,3 % (n=5), a mužjak s 16,7 % (n=1). (Slika 6.)

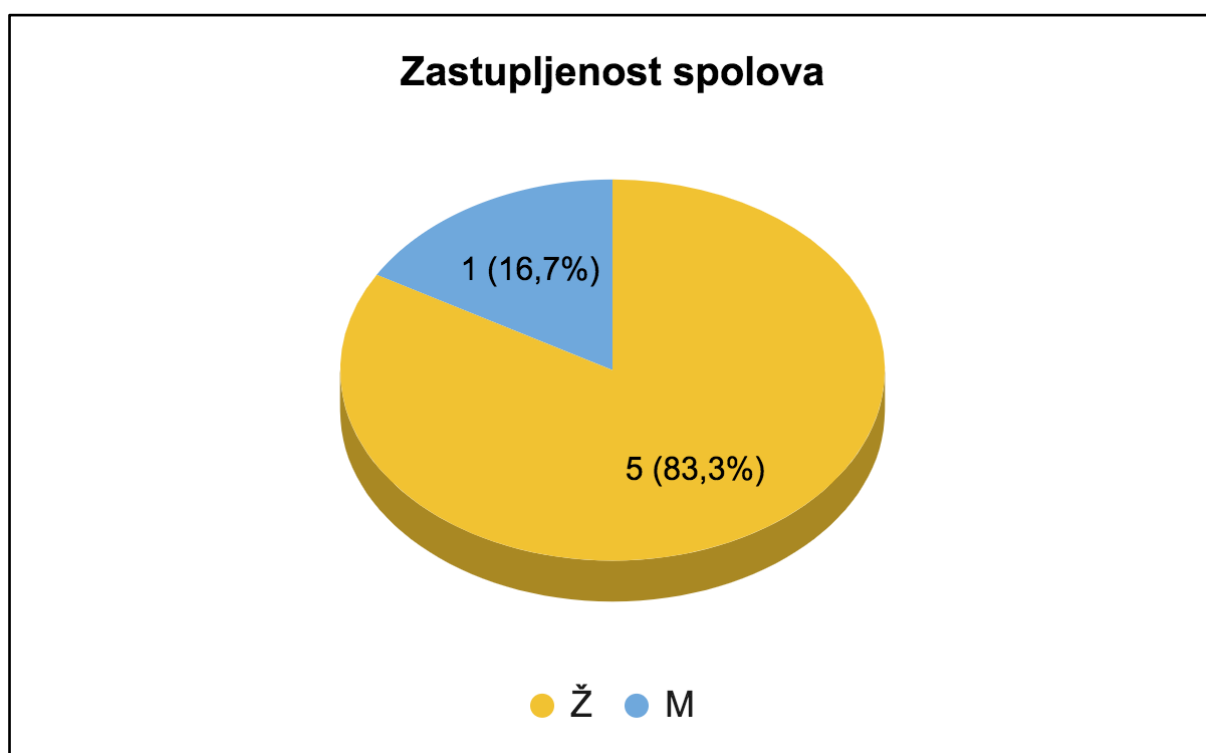
Prosječna starost u vrijeme kirurškog zahvata (unilateralne adrenalektomije) u istraživanoj je skupini bila 10 godina (raspon od 8 do 15 godina). (Slika 7.)

Prosječna tjelesna masa bila je 17,7 kg s rasponom od 6,3-38,0 kilograma. (Slika 8.)

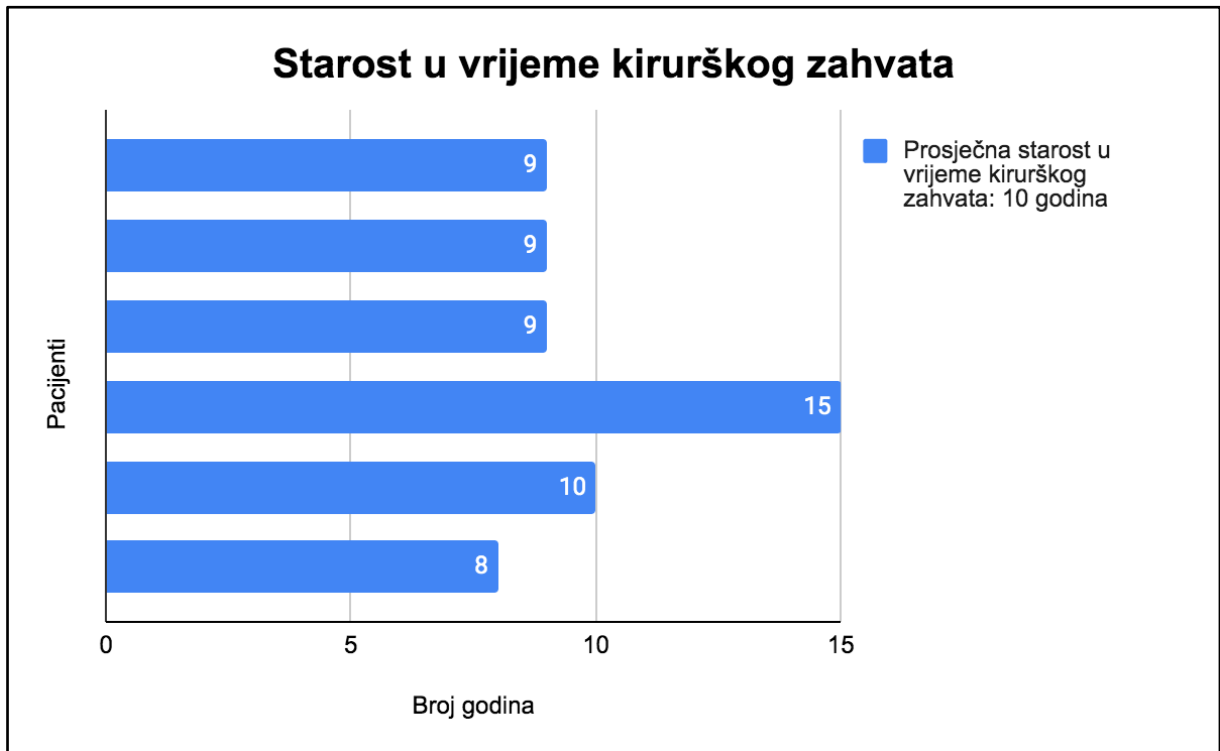
Omjer kastriranih i nekastriranih jedinki bio je 1/1 s 50% kastriranih jedinki (n=3) i 50% nekastriranih jedinki (n=3). (Slika 9.)



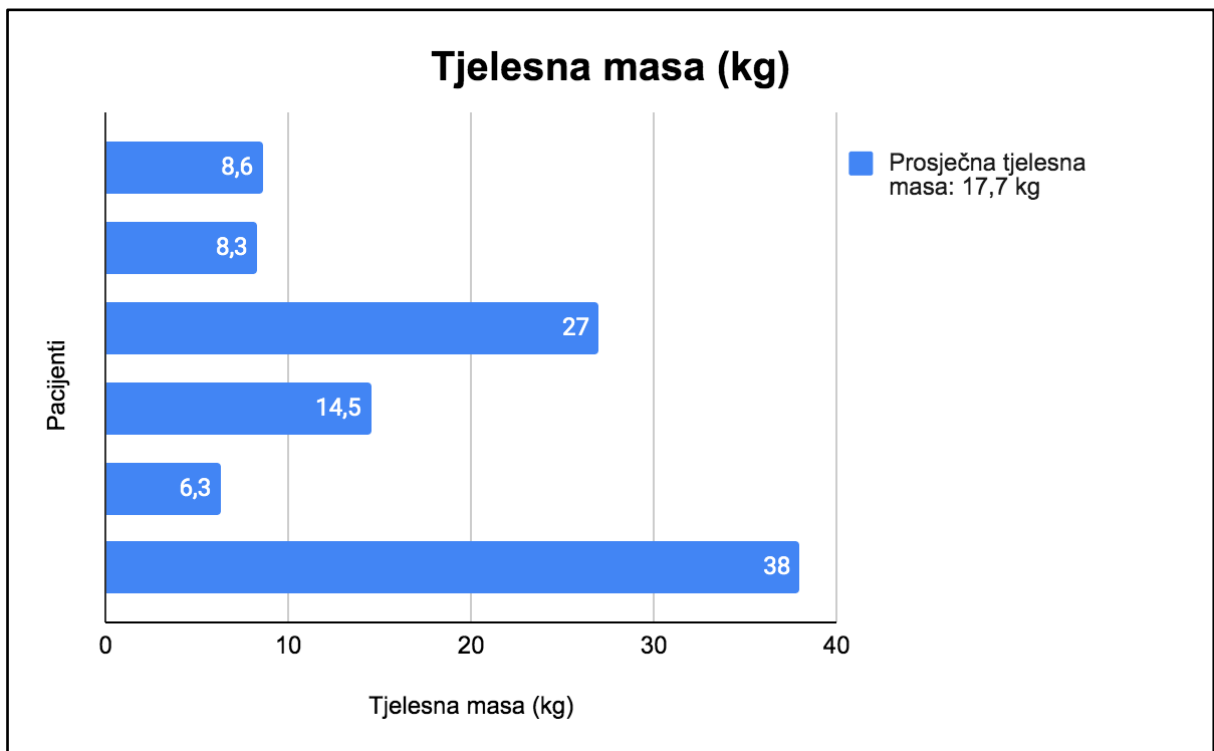
Slika 5. Pasminska zastupljenost u istraživanoj skupini



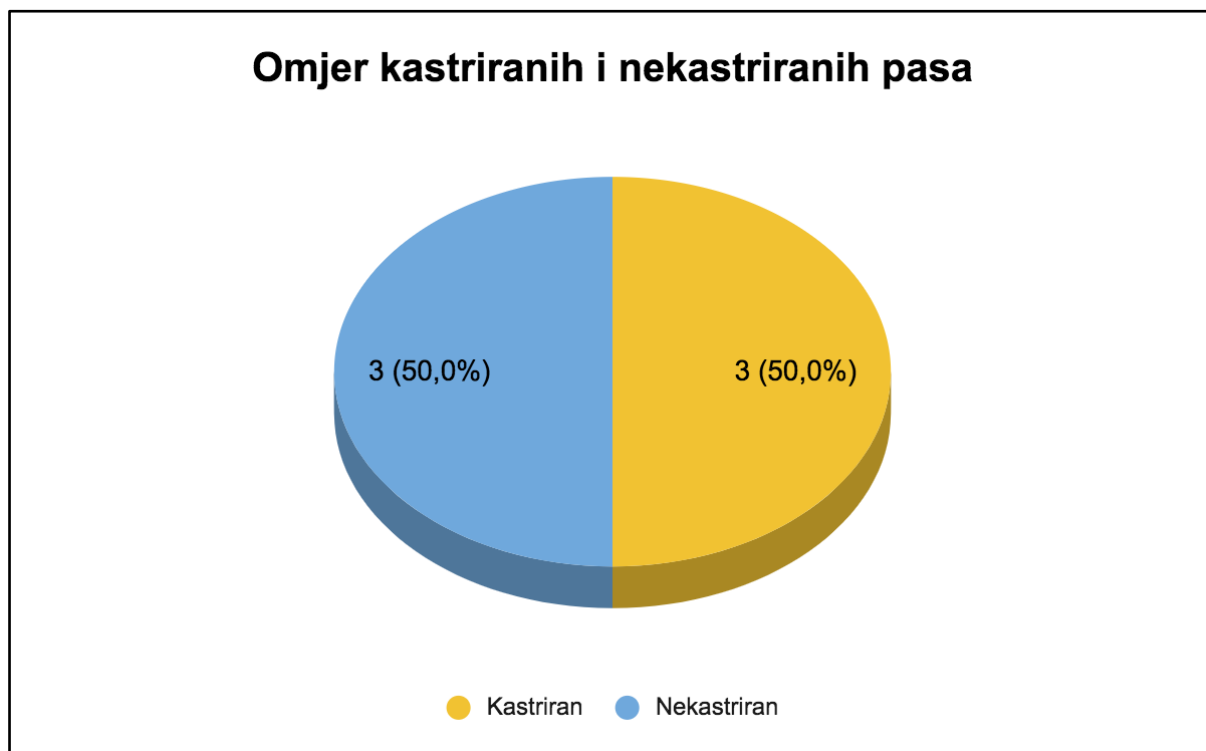
Slika 6. Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini



Slika 7. Starost i prosječna starost u vrijeme kirurškog zahvata



Slika 8. Tjelesna masa i prosječna tjelesna masa u istraživanoj skupini



Slika 9. Omjer kastriranih i nekastriranih pasa u istraživanoj skupini

4.2. Klinički simptomi

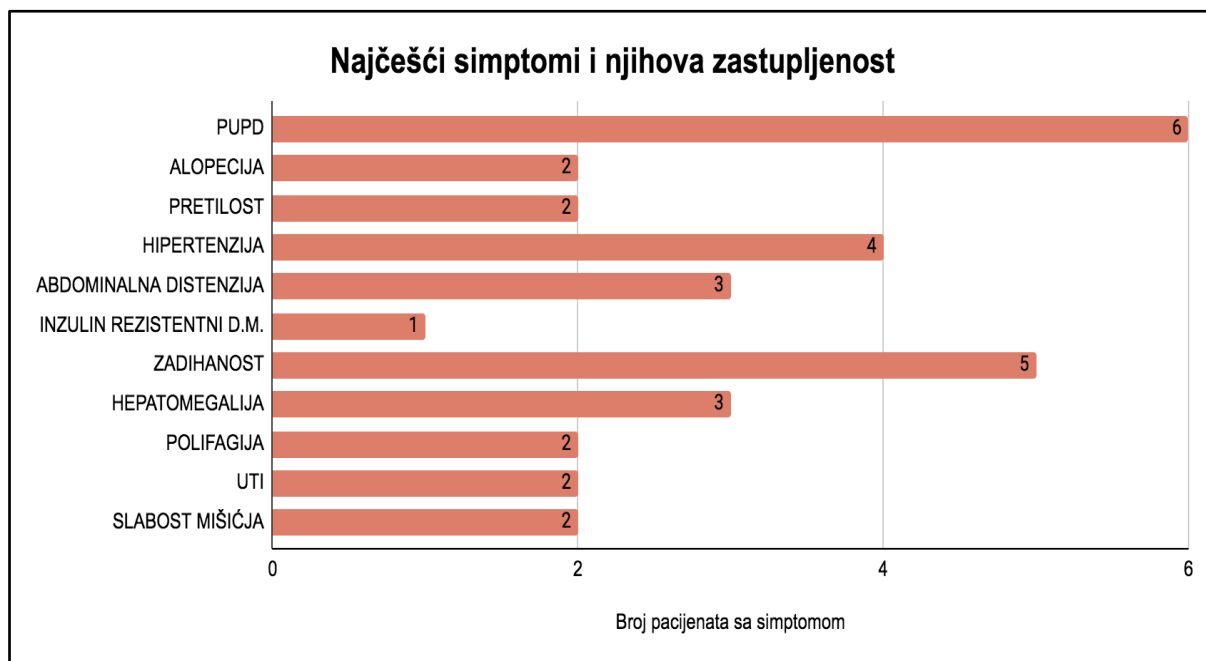
Od najčešćih simptoma HAC-a (tablica 1.) kod istraživane je skupine pomoću anamnestičkih podataka te pomoću kliničkog pregleda zabilježeno ukupno 10 simptoma. To su PUPD - poliurija/polidipsija, alopecija, pretilost, sistemska hipertenzija, abdominalna distenzija, dahtanje, hepatomegalija, polifagija, infekcija mokraćnog sustava te slabost mišićja. Ukupno je 6/6 pasa imalo poliuriju/polidipsiju (100 % od ukupnog broja pacijenata), 5/6 pasa pokazivalo je simptom dahtanja (83,3% od ukupnog broja pacijenata), sistemska hipertenziju imalo je 4/6 pasa (66,67% od ukupnog broja pacijenata), 3/6 pasa imalo je abdominalnu distenziju (50% od ukupnog broja pacijenata) te je 3/6 pasa imalo hepatomegaliju (50% od ukupnog broja pacijenata). Svaki od sljedećih simptoma: alopecija, polifagija, pretilost, infekcija mokraćnog sustava, slabost mišićja bio je prisutan u 2/6 (33.33% od ukupnog broja pacijenata). Samo je 1/6 pasa imao na inzulinsko rezistentni *diabetes mellitus* (16,67 % od ukupnog broja pacijenata). (Slika 10.)

4.3. Laboratorijske pretrage

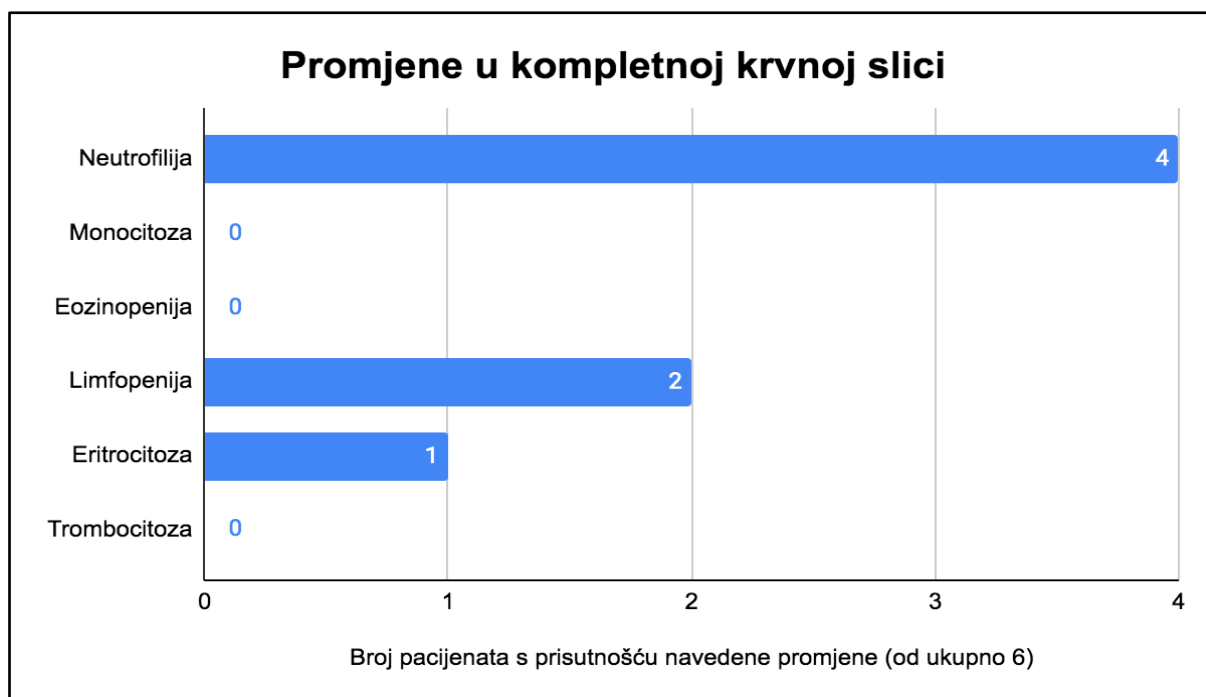
Pri kompletnoj krvnoj slici promatrana je prisutnost/odsutnost promjena sukladnih s tipičnim stresnim leukogramom (neutrofilija, monocitoza, eozinopenija, limfopenija). Neutrofiliju je imalo 4/6 pasa te je tako učestalost ove promjene 66,67 %, a 2/6 pasa imalo je limfopeniju (učestalost od 33,33%). Kod nijednog psa nije zabilježena monocitoza i eozinopenija. Isto tako ni trombocitoza nije zabilježena, a blaga eritrocitoza javila se u 1/6 pasa (16,67%). (Slika 11.)

Pri analizi biokemijskog profila najčešće zabilježene promjene bile su hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija. Obje su se pojavile u 3/6 pacijenata te je stoga učestalost ovih promjena bila 50%. Povišena koncentracija ALP-a, hiperglikemija i snižena koncentracija ureje javile su se u 2/6 pacijenata (učestalost od 33,33%). Povišena koncentracija ALT-a i snižena koncentracija fosfora u krvi zabilježene su u 1/6 pasa pa je učestalost ovih promjena 16,67%. (Slika 12.)

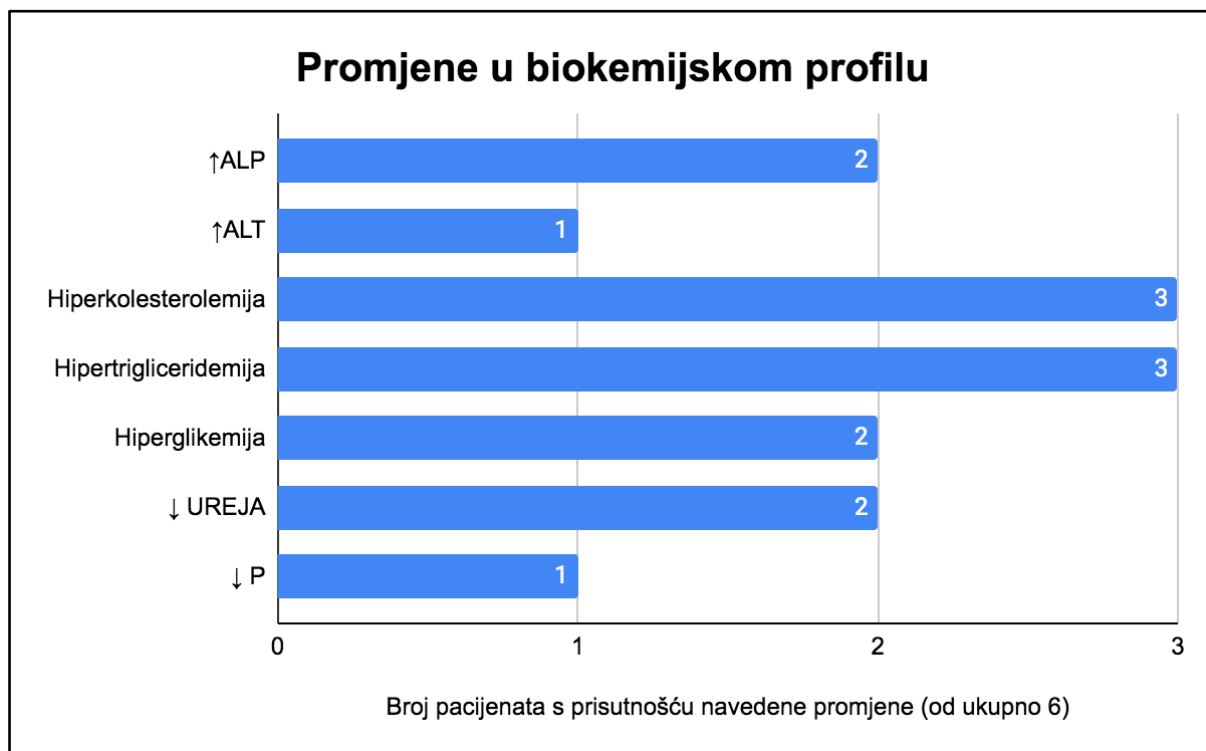
Analiza urina napravljena je u 4/6 pacijenata. Kod sva 4 pacijenta zabilježena je specifična težina mokraće $\leq 1.018-1.020$ (učestalost 100%) te hematurija (učestalost 100%). Proteinurija i bakterijurija zabilježene su u po 2/4 psa (učestalost od 50%). Kod jednog je psa zabilježena i glukozurija, no taj je pas imao istodobni na inzulin rezistentni *diabetes mellitus*. (Slika 13.)



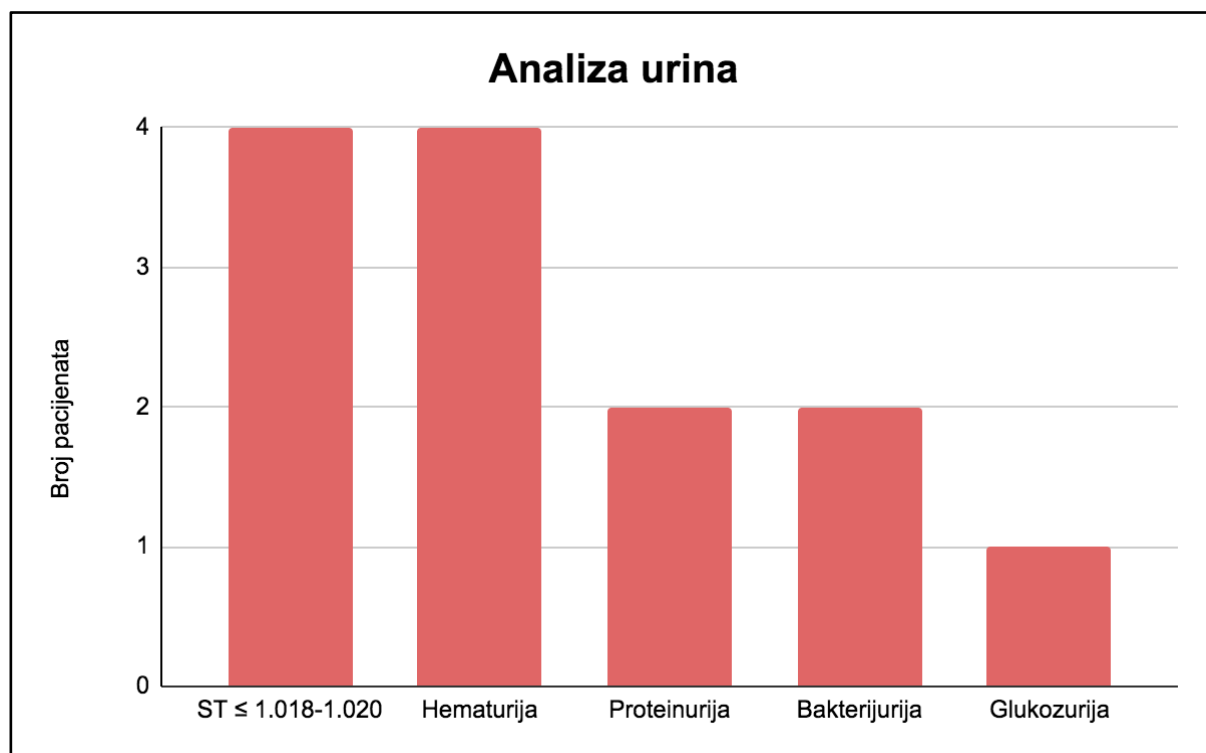
Slika 10. Najčešći simptomi i njihova zastupljenost



Slika 11. Promjene u kompletnoj krvnoj slici



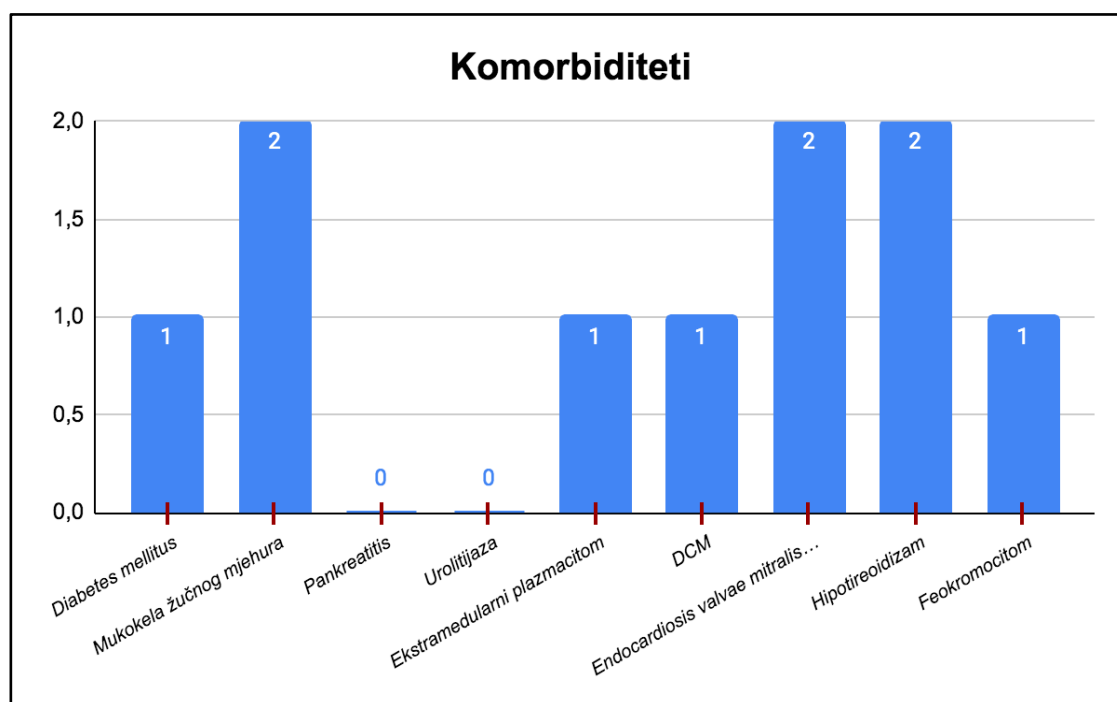
Slika 12. Promjene u biokemijskom profilu



Slika 13. Promjene zabilježene pri analizi urina

4.4. Komorbiditeti

Od najčešćih komorbiditeta (*diabetes mellitus*, mukokela žučnog mjehura, pankreatitis i urolitijaza) koji prate hiperadrenokorticism, zabilježen je *diabetes mellitus* u 1 psa (učestalost 16,67%) te mukokela u nastanku u 2 psa (učestalost 33,33%). Od ostalih komorbiditeta hipotireoidizam te endokardioza mitralnog i trikuspidalnog zaliska zabilježene su u 2/6 pasa (učestalost 33,33%), a dilatativna kardiomiopatija, ekstramedularni plazmacitom i feokromocitom u 1/6 pasa (učestalost 16,67%). (Slika 14.)



Slika 14. Zabilježeni komorbiditeti kod istraživane skupine

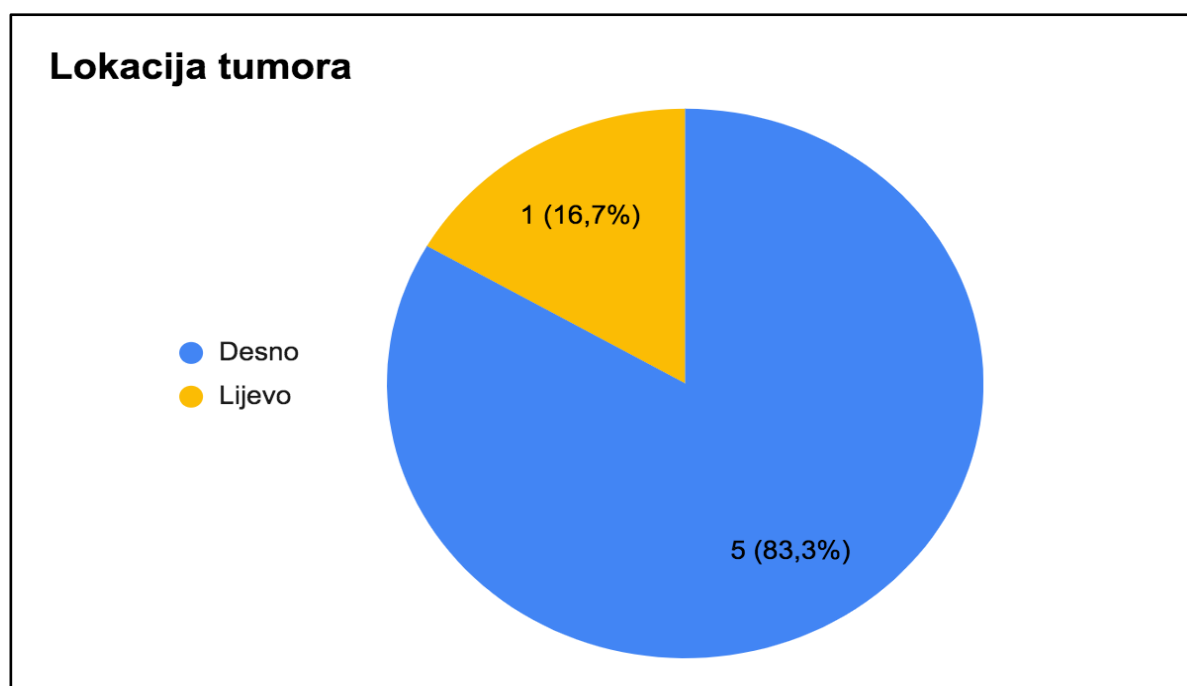
4.5. Slikovna dijagnostika

U svih 6 pacijenata napravljena je ultrazvučna pretraga abdomena. U 5 pacijenata je tumor bio lokaliziran na desnoj nadbubrežnoj žlijezdi (učestalost 83,3 %), dok se u 1 pacijenta tumor nalazio na lijevoj nadbubrežnoj žlijezdi (učestalost 16,67 %). (Slika 15., Tablica 4.)

Kod 4 pasa tumor nije uraštao u *v. cava caudalis* (učestalost 66,67 %). Kod 2/6 pasa bila je prisutna tumorska invazija krvnih žila (učestalost 33,33 %). Kod jednog je pacijenta tijekom

kirurškog zahvata zamijećeno djelomično uraštanje u *v. cava caudalis*, dok je kod drugog tumor uraštao u *a. renalis*. Kod svih se pacijenata tumor naslanjao na *v. cava caudalis*. U jednog je psa tumor u potpunosti prekinuo tok *v. cava caudalis*, dok je kod 2 pacijenta zabilježeno turbulentno gibanje krvi na mjestu gdje tumor naliježe na *v. cava caudalis*. (Tablica 4.)

Kod svih je pacijenata zabilježena zamjetna asimetrija između nadbubrežnih žlijezda pri čemu se uočavala i kontralateralna atrofija. Pri mjerenju veličine zahvaćene i kontralateralne nadbubrežne žlijezde posebna je pažnja usmjerena na debljinu nadbubrežnih žlijezda (dorzoventralna dimenzija). Kod svih 6 pacijenata u ovom istraživanju debljina je bila veća od 7.4 mm. Kod svih pasa ≤ 12 kg (n=3) debljina nadbubrežne žlijezde bila je veća od 0.62 cm, dok je kod svih pasa > 12 kg (n=3) bila veća od 0.75 cm. Prosječna debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde iznosila je 1,66 cm. Kod svih 6 pacijenata kontralateralna nadbubrežna žlijezda bila je manja od 0.32 cm . (Tablica 5.)



Slika 15. Lokacija tumora

Tablica 4. Lokacija tumora, veličina zahvaćene nadbubrežne žlijezde i uraštanje u *v. cava caudalis/a. Renalis*

Pacijent	Lokacija	Veličina zahvaćene nadbubrežne žlijezde	Uraštanje u <i>v. cava caudalis/a.renalis</i>
1	D	2,37 cm x 1,27 cm (kranijalni pol) x 0,4 cm (kaudalni pol)	NE (drži se v.c.c)
2	D	1,4 cm x 1 cm	NE (drži se v.c.c, turbulentno gibanje krvi)
3	D	3,5 cm x 3,6 cm	DA (u potpunosti prekida tok v.c.c., urašta u <i>a.renalis</i>)
4	D	1,51 cm x 1,04 cm	NE (tik uz v.c.c)
5	L	1 cm x 1,33 cm (kranijalni pol) x 0,9 cm (kaudalni pol)	NE (drži se v.c.c, turbulentno gibanje krvi)
6	D	4,09 cm x 1,76 cm	DA (urasla dijelom u v.c.c, turbulentno gibanje krvi)

Tablica 5. Debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde i debljina kontralateralne nadbubrežne žlijezde

Pacijent	Tjelesna masa	Debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde	Debljina kontralateralne nadbubrežne žlijezde
1	≤ 12 kg	1.27 cm	0.42 cm
2	≤ 12 kg	1 cm	0.29 cm
3	> 12 kg	3.6 cm	0.35 cm
4	> 12 kg	1.04 cm	0.37 cm
5	≤ 12 kg	1.33 cm	0.32 cm
6	> 12 kg	1.76 cm	0.21 cm

4.6. Adrenalni funkcijski testovi

Kod 3 je pacijenta kao „screening” test odabran ACTH stimulacijski test, a kod 3 pacijenta odabran je LDDST. (Tablica 6.)

Pri ACTH stimulacijskom testu, laboratorijski određena normalna koncentracija bazalnog kortizola je 13.8 - 165.6 nmol/L, a fiziološka koncentracija stimuliranog kortizola je 165-470 nmol/L. Koncentracija stimuliranog kortizola < 55 nmol/L ide u prilog jatrogenom hiperadrenokorticismu ili Addisonovoj bolesti. Koncentracija stimuliranog kortizola 55-165 nmol/L rubni je rezultat tj. „siva zona” za Addisonovu bolest. Koncentracija stimuliranog kortizola 470-600 nmol/L rubni je rezultat tj. „siva zona” za hiperadrenokorticism, a

koncentracija stimuliranog kortizola veća od 600 nmol/L visoko je sugestivna na hiperadrenokorticismam.

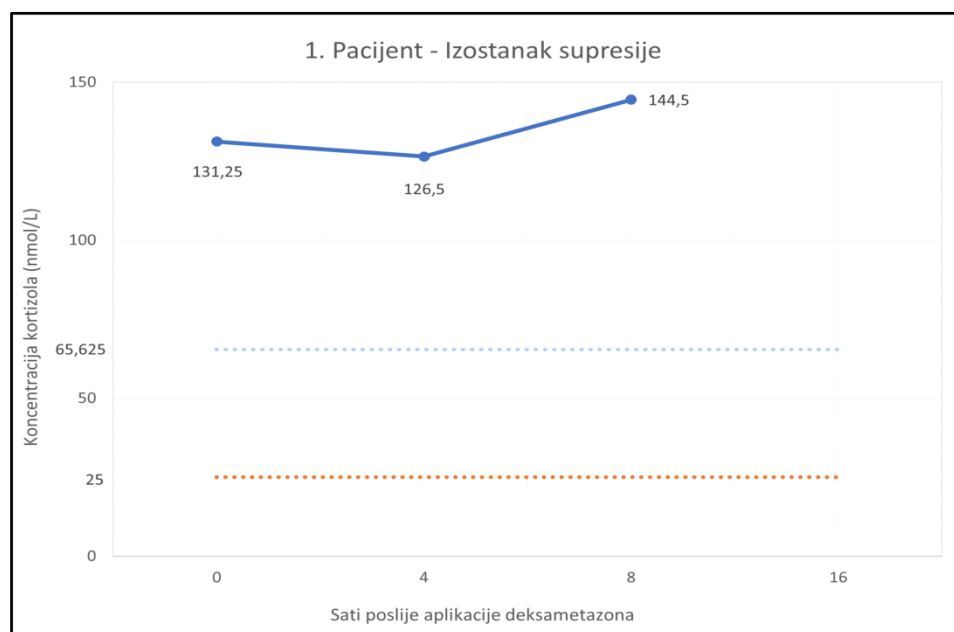
Pri testu supresije niskom dozom deksametazona (LDDST) laboratorijski određena normalna koncentracija bazalnog kortizola iznosila je 12,5 - 162,5 nmol/L tj. 5-65 ng/mL. Vrijednosti kortizola 4 i 8 sati nakon aplikacije deksametazona fiziološki bi trebale biti niže od 25 nmol/L (10 ng/mL). Ako je koncentracija kortizola 4 i/ili 8 sati nakon aplikacije deksametazona viša od 25 nmol/L (10 ng/mL), nalaz upućuje na mogući hiperadrenokorticismam.

Od 3 psa kod kojih je napravljen ACTH stimulacijski test, 2 su imala koncentracije stimuliranog kortizola visoko sugestivne na hiperadrenokorticismam (>600 nmol/L), dok je u 1 psa zabilježena koncentracija stimuliranog kortizola od 542.8 nmol/L koja bi odgovarala tzv. „sivoj zoni” odnosno rubnom rezultatu za hiperadrenokorticismam. (Tablica 6.)

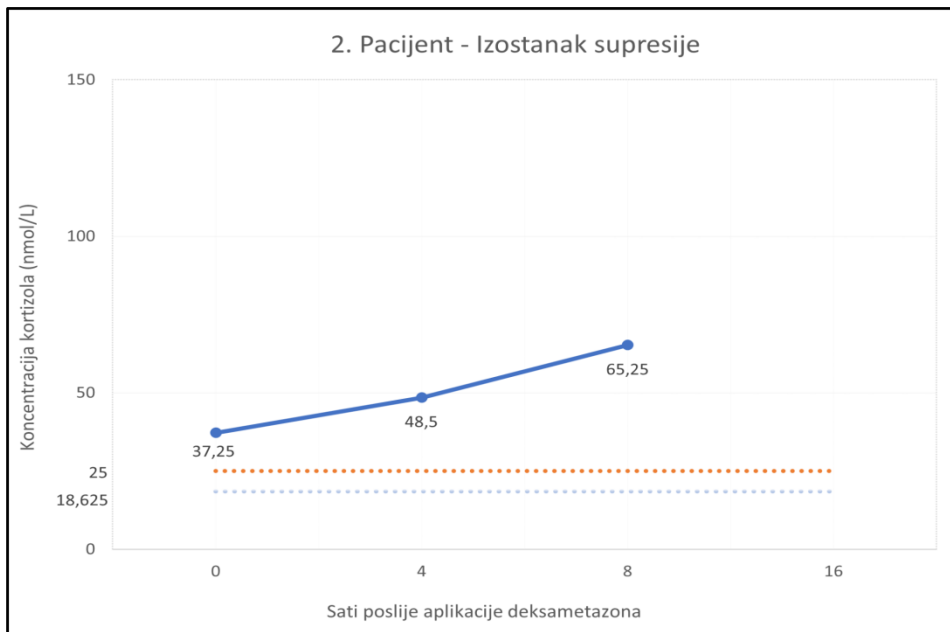
Od 3 psa kod kojih je napravljen test supresije niskom dozom deksametazona, kod svih su vrijednosti kortizola 4 i 8 sati nakon aplikacije deksametazona bile više od 25 nmol/L. Kod 2 je psa bio prisutan uzorak izostanka supresije s koncentracijama kortizola 4 i 8 sati nakon aplikacije deksametazona iznad „cut-off” vrijednosti (25 nmol/L) te su iste bile više od 50% bazalne koncentracije kortizola. (Slika 16. i 17.) Kod 1 je psa primjećen uzorak parcijalne supresije s koncentracijama kortizola 4 i 8 sati nakon aplikacije deksametazona iznad „cut-off” vrijednosti, no obje su koncentracije bile niže od 50% bazalne koncentracije kortizola. (Slika 18).

Tablica 6. Adrenalni funkcijski testovi

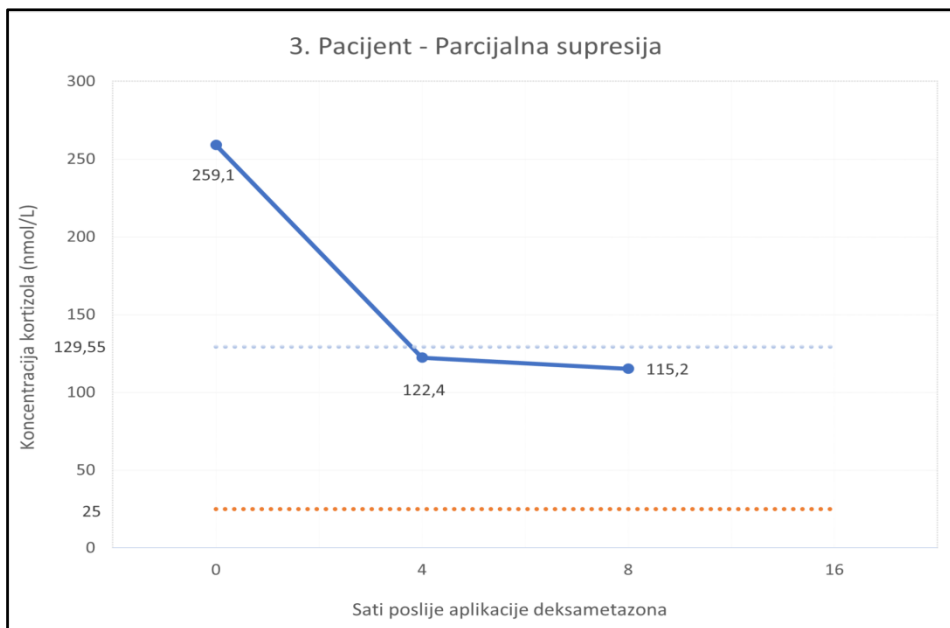
Pacijent	Funkcijski test	Rezultat
1	ACTHST	bazalni kortizol: 350.5 nmol/L stim. kortizol: 648.6 nmol/L
2	ACTHST	baz. kortizol: 54.2 nmol/L stim. kortizol: 709 nmol/L
3	LDDST	baz. kortizol: 259.1 nmol/L 4h: 122.4 nmol/L 8h: 115.2 nmol/L
4	LDDST	baz. kortizol: 131.25 nmol/L 4h: 126.5 nmol/L 8h: 144.5 nmol/L
5	LDDST	baz. kortizol: 37.25 nmol/L 4h: 48.5 nmol/L 8h: 65.25 nmol/L
6	ACTHST	baz. kortizol: 102 nmol/L stim. kortizol: 542.8 nmol/L



Slika 16. Izostanak supresije. Pacijent broj 4 iz tablice 6.



Slika 17. Izostanak supresije. Pacijent broj 5 iz tablice 6.



Slika 18. Parcijalna supresija. Pacijent broj 3 iz tablice 6.

4.7. Histopatološki parametri

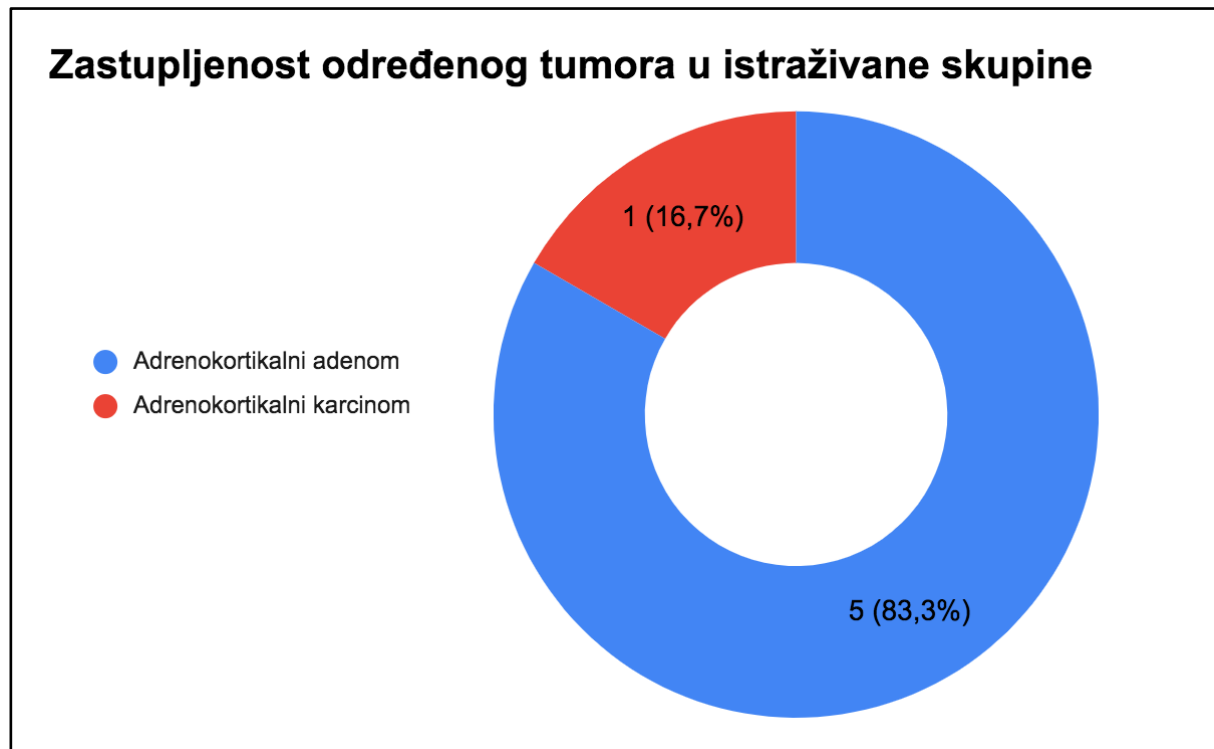
Histopatološkoj pretrazi i Ki67 imunohistokemijskom bojanju podvrgnuto je ukupno 7 uzoraka tumora od 6 pacijenata. Kod jednog je pacijenta pretraga napravljena i na metastazi primarnog tumora koja je identificirana i uzorkovana 2 godine nakon primarnog tumora (uzorak 3a i 3b u tablici 7).

U 5 pasa histopatološki je dijagnosticiran adrenokortikalni adenom (83.3%), dok je u jednog psa dijagnosticiran adrenokortikalni karcinom (16.7%). (Slika 19.) Prethodno navedena analizirana metastaza pripadala je upravo tom pacijentu koji je imao adrenokortikalni karcinom. Bitno je naglasiti da je jedan od 5 pasa koji su imali dijagnozu adrenokortikalnog adenoma, imao i konkurentnu dijagnozu feokromocitoma.

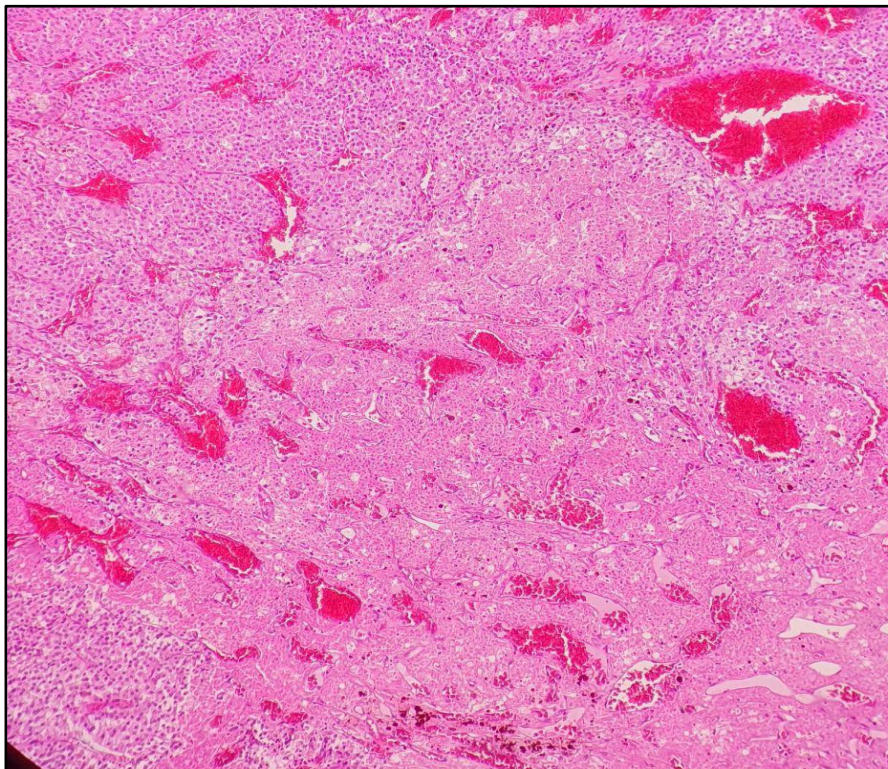
Ukupno je 5/7 uzoraka imalo više od 33% stanica s prozirnrom/vakuoliziranom citoplazmom (slika 22. i 23., tablica 7.), a nekroza je bila prisutna u ukupno 3/7 uzoraka (slika 20. i 21., tablica 7.). Nekroza se smatrala prisutnom kada su bila vidljiva konfluirajuća gnijezda nekrotičnih stanica sa kariopiknotičnim jezgrama. (Slika 20. i 21.)

Broj stanica pozitivnih na Ki67 imunohistokemijsko bojanje (slika 24.) izražen je kao postotak pozitivnih stanica na ukupno 1000 stanica. Raspon Ki67 bio je 0.7 - 6.4 %, a prosječni Ki67 indeks proliferacije bio je 3,18 %.

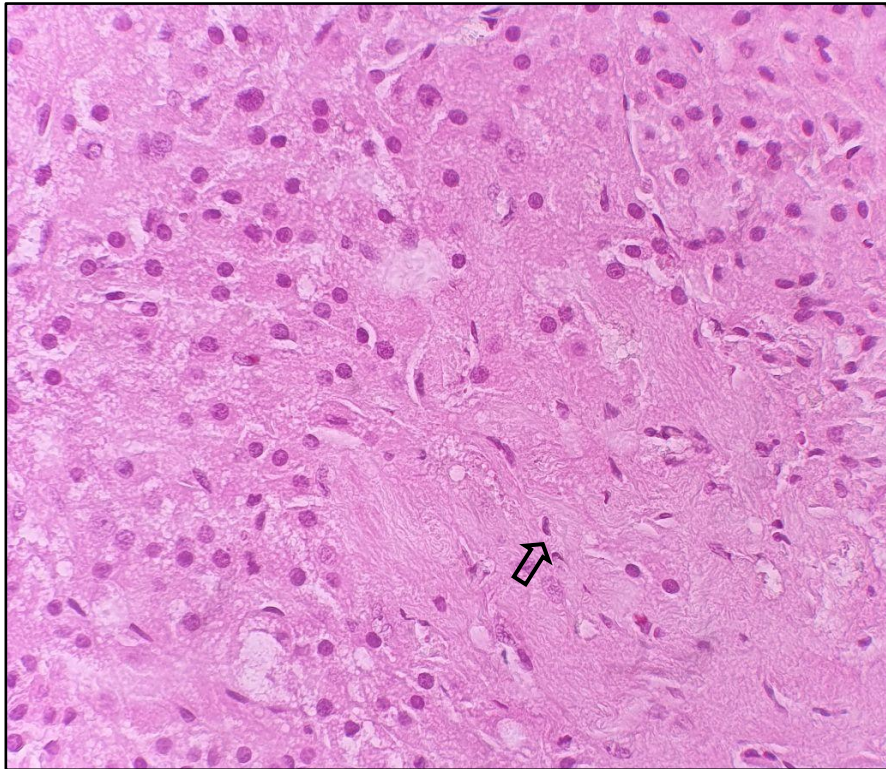
Ovisno o nekrozi, zastupljenosti vakuoliziranih stanica te Ki67 indeksu proliferacije izračunat je svakom pacijentu ukupni zbroj Utrechtskog bodovnog sustava. Najmanji zbroj iznosio je 2.9, a najveći 10.8. Prosječni zbroj iznosio je 7,32. Najveći zbroj izračunat je upravo na uzorku metastaze adrenokortikalnog karcinoma. (Tablica 7).



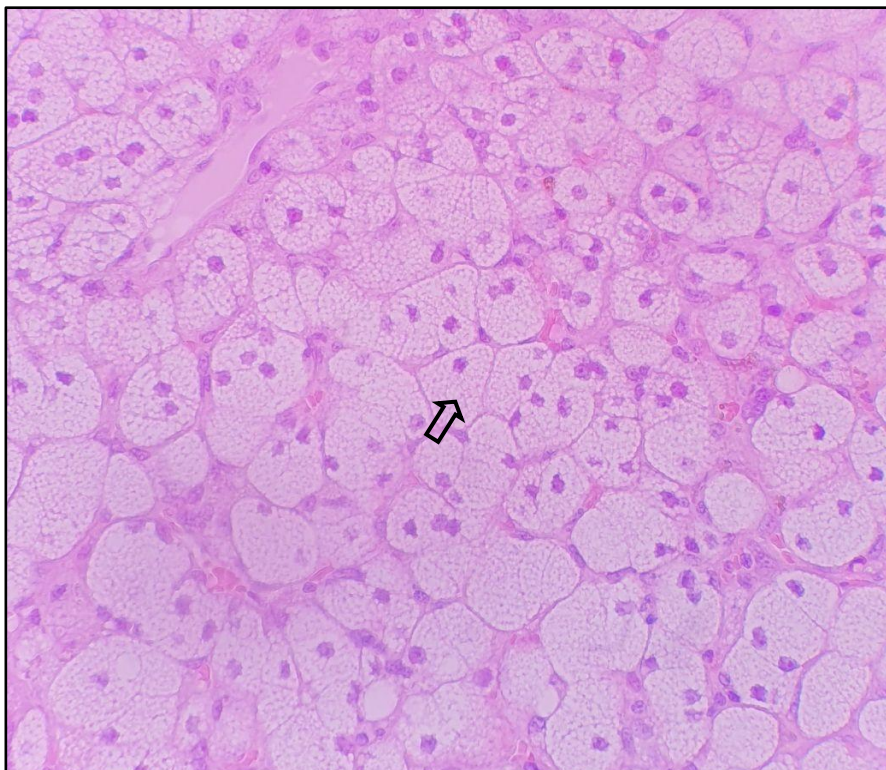
Slika 19. Zastupljenost tumora u istraživanoj skupini



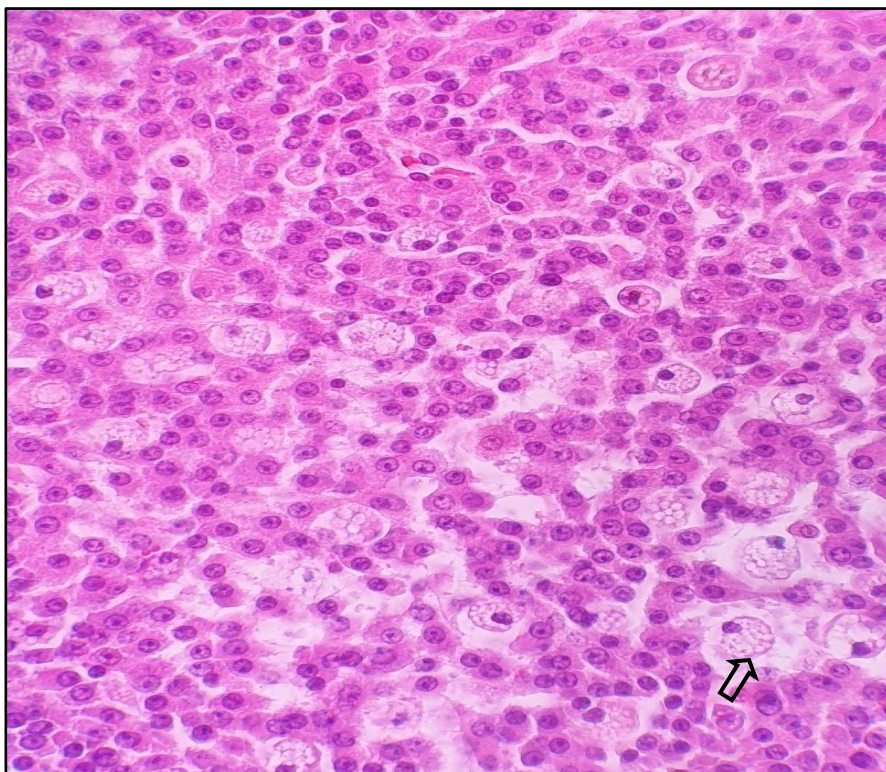
Slika 20. Metastaza adrenokortikalnog karcinoma, nekrotično područje s krvarenjima, pas, HE x 20



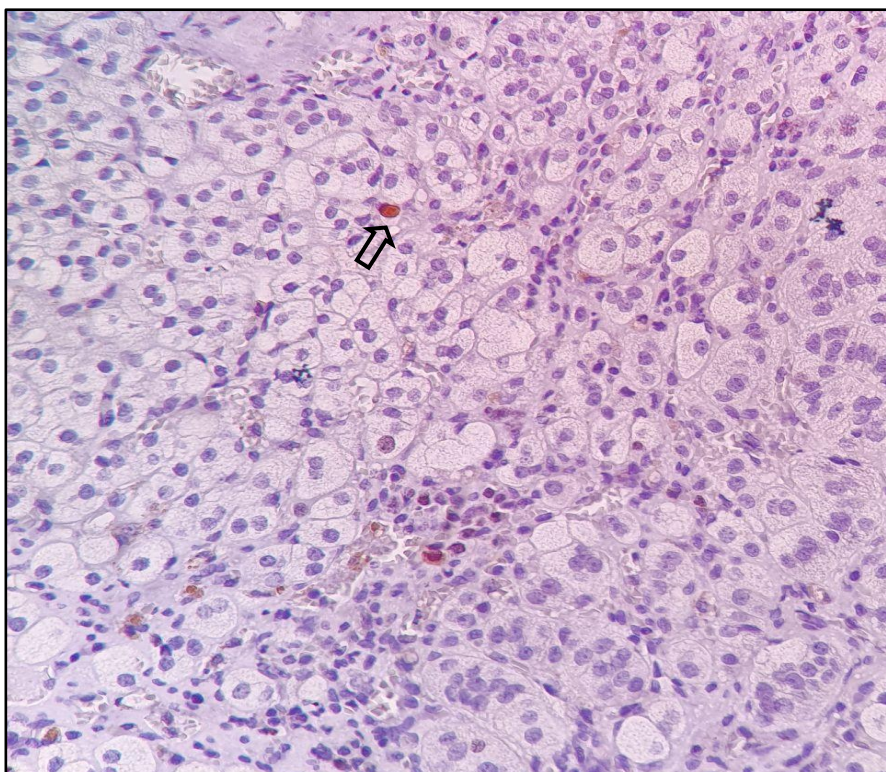
Slika 21. Adrenokortikalni adenom, nekrotično područje s kariopiknotičnim jezgama, crnom strelicom označena je kariopiknotična jezgra, pas, HE x 40



Slika 22. Adrenokortikalni adenom, crnom strelicom označena je vakuolizirana citoplazma stanice, pas, HE x 40



Slika 23. Adrenokortikalni adenom, crnom strelicom označena je vakuolizirana citoplazma stanice, pas, HE x 40



Slika 24. Adrenokortikalni adenom, crnom strelicom označena je stanica pozitivna na imunohistokemijski biljeg Ki67, pas, IHC x 40

Tablica 7. Histopatološka dijagnoza, histopatološki parametri i Utrechtski bodovni sustav

Uzorak	Histopatološka dijagnoza	Ki67 indeks proliferacije	Više od 33% stanica ima prozirnu/vakuoliziranu citoplazmu	Prisutnost nekroza	Utrecht score
1	Adrenokortikalni adenom	$57/1000 = 5.7$ %	DA	NE	$5.7 + 4 + 0 =$ 9.7
2	Adrenokortikalni adenom	$11/1000 = 1.1$ %	NE	DA	$1.1 + 0 + 3 =$ 4.1
3a	Adrenokortikalni karcinom	$17/1000 = 1.7$ %	DA	DA	$1.7 + 4 + 3 =$ 8.7
3b	Metastaza adrenokortikalnog karcinoma	$38/1000 = 3.8$ %	DA	DA	$3.8 + 4 + 3 =$ 10.8
4	Adrenokortikalni adenom	$29/1000 = 2.9$ %	NE	NE	$2.9 + 0 + 0 =$ 2.9
5	Adrenokortikalni adenom	$64/1000 = 6.4$ %	DA	NE	$6.4 + 4 + 0 =$ 10.4
6	Feokromocitom srži i adenom zone fasciculate	$7/1000 = 0,7\%$	DA	NE	$0.7 + 4 + 0 =$ 4.7

Nakon izračunatog ukupnog zbroja Utrechtskog bodovnog sustava svakom pacijentu uzorci su ovisno o ukupnom zbroju podijeljeni u skupine: $US < 6$, $US \geq 6$ do < 11 i $US \geq 11$. Ukupno je 3 uzorka pripadalo u prvu skupinu (3 psa - 50%), u drugu skupinu pripadalo je 4 uzorka (3 psa - 50%), a niti jedan uzorak nije pripadao u treću skupinu. Na temelju prijašnjih istraživanja poznato je da za pacijente iz prve skupine ($US < 6$) nije poznato točno vrijeme preživljavanja jer ono nije dostignuto, no sigurno iznosi više od prosječnog vremena poznatog za drugu skupinu ($US \geq 6$ do < 11). Za skupinu 2 ono iznosi 51.5 mjeseci, dok prosječno vrijeme preživljavanja za skupinu 3. iznosi 14.4. mjeseca. U skladu s time, u pasa iz prve skupine prisutna je niska mogućnost povrata tumora, dok je u drugoj skupini prisutan umjeren rizik za povrat tumora. (Tablica 8.)

Na kraju je ukupni zbroj Utrechtskog bodovnog sustava uspoređen sa stvarnim vremenom preživljenja pacijenata istraživane skupine. Radi činjenice da su 2 od navedenih 6 pacijenata još uvijek živi, kod njih ukupni zbroj nije mogao biti uspoređen sa stvarnim vremenom

preživljenja tj. isti su cenzurirani. Jedan od njih imao je Utrecht score 9.7, što ga svrstava u drugu skupinu s umjerenim rizikom za povrat tumora te prosječnom preživljavanju od 51.5 mjesec. Taj je pacijent trenutno živ već 31 mjesec nakon operativnog zahvata. Drugi cenzurirani pacijent imao je US 2.9, što ga svrstava u skupinu s niskim rizikom povrata tumora (Tablica 8.)

U tablici 8. navedeni su uzroci smrtnog ishoda (uginuća ili eutanazije).

Tablica 8. Usporedba Utrechtskog bodovnog sustava sa stvarnim ishodima u istraživanoj skupini te individualne procjene prognoze i mogućnosti povrata tumora.

Utrecht score	Skupina	Prognoza	Rekurencija	Stvarni ishod	Razlog
9.7	≥ 6 do < 11	prosječno 51.5 mjesec	umjeren rizik za povrat tumora	još uvijek živ	/
4.1	< 6	? min. 54 mj.?	niska mogućnost povrata tumora	6 godina (72 mjeseca)	potpuna disregulacija <i>diabetes mellitusa</i>
8.7	≥ 6 do < 11	prosječno 51.5 mjesec	umjeren rizik za povrat tumora	2 godine (24 mjeseca)	uginuo 1 sat nakon operacije metastaze na jetri
10.8	≥ 6 do < 11	prosječno 51.5 mjesec	umjeren rizik za povrat tumora	/	/
2.9	< 6	? min. 54 mj.?	niska mogućnost povrata tumora	još uvijek živ	/
10.4	≥ 6 do < 11	prosječno 51.5 mjesec	umjeren rizik za povrat tumora	30 mjeseci	arest pri buđenju iz anestezije pri punkciji tvorbe u prsnom košu (susp. tumor pluća)
4.7	< 6	? min. 54 mj.?	niska mogućnost povrata tumora	20 mjeseci	eutaniziran zbog DCM-a (ascites, edem pluća, bez terapijskog poboljšanja)

4.8. Usporedba kliničkih parametara s vremenom preživljenja

Na kraju su klinički parametri (parametri vezani uz psa i parametri vezani uz tumor) uspoređeni s prosječnim vremenom preživljavanja. Kao i kod usporedbe Utrechtskog bodovnog sustava sa stvarnim vremenom preživljavanja, dva smo pacijenta i kod ove analize morali cenzurirati jer su još uvijek živi.

Na razini značajnosti 0.05, pomoću Cox proportional hazard modela u programu R-studio analizirano je imaju li sljedeće varijable statistički značajan utjecaj na vrijeme preživljenja: spol (ženka/mušjak), kastracijski status (kastričan/nekastričan), starost u vrijeme kirurškog zahvata, tjelesna masa, preoperativno tretiranje HAC-a (da/ne), lokacija tumora (desna/lijeva), prisutnost venske invazije (da/ne) i debljina nadbubrežne žlijezde koja je tumorom zahvaćena. Starost, težina i debljina nadbubrežne žlijezde su numeričke neprekidne varijable. Spol, kastracijski status, lokacija, venska invazija i preoperativno tretiranje hiperkortizolizma su kvalitativne nominalne varijable. Rezultati su pokazali da niti jedna od navedenih varijabli nema statistički značajan utjecaj na preživljenje. (Tablica 9.)

Tablica 9. Utjecaj kliničkih parametara na vrijeme preživljenja.

Parametar	Distribucija	Ukupni broj pacijenata	Hazard ratio (95% CI)	P vrijednost
Spol	5 ženki, 1 mužjak	6	3.027 (0.048 - 6.007)	0.629
Kastracijski status	3 da, 3 ne	6	15.641 (0.2438 - 31.04)	0.396
Tjelesna masa	17.7 (6.3-38) kg	6	1.036 (0.9471 - 1.126)	0.465
Starost u vrijeme kirurškog zahvata	10.0 (8-15) god.	6	2.920 (0.1766 - 5.663)	1.000
Preoperativno tretiranje HAC-a	2 da, 4 ne	6	10.448 (0.1665 - 20.73)	0.629
Lokacija	1 lijevo, 5 desno	6	3.027 (0.048 - 6.007)	0.629
Invazija krvnih žila tumorom	2 da, 4 ne	6	10.448 (0.1665 - 20.73)	0.629
Promjer (debljina) zahvaćene nadbubrežne žlijezde	1.67 (1.0-3.6) cm	6	2.287 (0.543 - 4.032)	0.459

5. RASPRAVA

Od ukupno 6 pasa uključenih u ovo istraživanje, najbrojniji su bili zapadno-škotski terijeri (n=2) i mješanci (n=2) s učešćem od 33,3%. Ostale su pasmine (samojed i američki stafordski terijer) bile zastupljene s 16,7%. Obzirom da u prijašnjim istraživanjima (BELLUMORI i sur., 2013.) nije dokazano postojanje pasminske predispozicije kod HAC-a neovisnog o ACTH te nije dokazana veća sklonost u zapadno-škotskih terijera ili mješanaca, pretpostavlja se da je ovo slučajan nalaz radi malog broja pacijenata.

U ovom istraživanju ženke su bile zastupljene s 83,3% (n=5) dok su mužjaci bili zastupljeni s 16,7% (n=1). Takav je nalaz kompatibilan s ostalim istraživanjima u kojima je ustanovljena povećana učestalost hiperadrenokorticisma kod ženki. U tom su istraživanju ženke činile većinu s udjelom od 60-65% u odnosu na mužjake (FELDMAN i NELSON, 2015).

U ovom je istraživanju hiperadrenokorticismam bio jednako učestao u nekastriranih (50%) i kastriranih (50%) jedinki, no HOFFMAN i sur., (2018) pokazali su moguću veću pojavnost u kastriranih jedinki.

Prosječna starost u vrijeme kirurškog zahvata iznosila je 10 godina (raspon od 8 do 15 godina), što se slaže s činjenicom da je većina pasa oboljelih od hiperadrenokorticisma starija od 6 godina. (LING i sur., 1979; GALELLI i sur., 2010., GALAC i sur., 2010., FELDMAN i NELSON, 2015.). U ovom istraživanju 5/6 pasa (83.3%) bilo je starije od 9 godina, što je u skladu s navodima ETTINGER i sur., (2017) koji su opisali da je većina (više od 90%) pasa s hiperadrenokorticismom ovisnim o nadbubrežnoj žlijezdi (ADH) starije od 9 godina.

Prosječna tjelesna masa iznosila je 17.7 kilograma, s rasponom od 6.3-38.0 kg. Autori REUSCH i FELDMAN (1991) utvrdili su da psi teži od 20 kilograma češće imaju adrenokortikalne tumore u odnosu na PDH. U ovom su istraživanju svi psi imali adrenokortikalni tumor, no samo je 2/6 (33,33%) pasa imalo više od 20 kilograma. U istraživanju koje su proveli SANDERS i sur. (2019), koji su ujedno i prvi predložili ideju Utrechtskog bodovnog sustava, raspon tjelesne mase kod pasa s hiperadrenokorticismom uzrokovanim adrenokortikalnim tumorom bio je 3.6-74.7 kilograma, s prosjekom od 14,2 kilograma. Takav širi raspon odgovara rasponu tjelesne mase utvrđenom u ovom istraživanju.

Od kliničkih je simptoma u ovom istraživanju najčešći simptom bio PUPD s učestalošću od 100%. To odgovara nizu drugih istraživanja koja su potvrdila PUPD kao najčešći simptom, s učestalošću od 82-91%. (LING i sur., 1979; PETERSON, M.E., 1984; REUSCH i FELDMAN, 1991; BENNAIM i sur., 2018). Sistemska je hipertenzija u ovom istraživanju zabilježena u 66.67% pacijenata, što odgovara navodima u literaturi koji govore o javljanju sistemske hipertenzije u 31-86% slučajeva (COWGILL, 1991; ORTEGA i sur., 1996; LIEN i sur., 2010; REUSCH i sur., 2010). Hepatomegalija se javila u 50% slučajeva, što također odgovara literaturnim (50-67%) navodima. (LING i sur., 1979; PETERSON, M.E., 1984; REUSCH i FELDMAN, 1991). Abdominalna se distenzija javila u 50% slučajeva, što je nešto rjeđe nego u drugim istraživanjima (67-73%). (LING i sur., 1979; PETERSON, M.E., 1984; REUSCH i FELDMAN, 1991; BENNAIM i sur., 2018). Alopecija i polifagija javile su se u 33.33% slučajeva, što je također rjeđe nego u drugim istraživanjima. (LING i sur., 1979; PETERSON, M. E., 1984, REUSCH i FELDMAN, 1991; BENNAIM i sur., 2018). Smanjena pojavnost ovih simptoma može se objasniti s time što često vlasnici polifagiju tumače kao odličan apetit i to prepoznaju kao nešto pozitivno, a alopeciju smatraju isključivo dermatološkim simptomom te se često ne odlučuju na daljnju dijagnostiku. Interesantan podatak je da je u ovom istraživanju zadihanost bila prisutna u 83,3% slučajeva, što je češće nego u prethodno navedenim istraživanjima.

U kompletnoj krvnoj slici najčešća je promjena bila neutrofilija s učestalošću od 66.67%, što je više nego je zabilježeno u istraživanju LING i sur., (1979) i BENNAIM i sur., (2018) kod kojih je učestalost ove promjene iznosila 22-24%. Kod 2/6 pasa bila je prisutna limfopenija (učestalost od 33.33%), što je u skladu s literaturom u kojoj se ova promjena javlja u 14-79.4% slučajeva. Blaga eritrocitoza u ovom se istraživanju javila u 16.67% slučajeva, što je također u skladu s literaturom i opisanom učestalošću od 9.5-17% (LING i sur., 1979; PETERSON, M. E., 1984; REUSCH i FELDMAN, 1991, BENNAIM i sur., 2018).

Najčešće zabilježene promjene u biokemijskom profilu bile su hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija. Obje su se pojavile u 3/6 pacijenata te je stoga učestalost ovih promjena bila 50%. Visoka učestalost ovih biokemijskih promjena odgovara visokoj učestalosti (73-90%) navedenoj u prethodnim istraživanjima (LING i sur., 1979; PETERSON, M. E., 1984; REUSCH i FELDMAN, 1991, BENNAIM i sur., 2018). Zanimljivo je da su se u ovom istraživanju povišena koncentracija ALP-a (33,33%) i ALT-a (16,67%) javile znatno rjeđe nego u ostalim istraživanjima, gdje se povišena koncentracija ALP-a javlja u 76-100%, a

povišena koncentracija ALT-a u 80-95% slučajeva (LING i sur., 1979; PETERSON, M. E., 1984; REUSCH i FELDMAN, 1991, BENNAIM i sur., 2018). Hiperglikemija i snižena koncentracija ureje javile su se u 2/6 pacijenata (učestalost od 33,33%), što odgovara opisanoj učestalosti ovih promjena u istraživanjima. Naime, prema mnogim se autorima snižena koncentracija ureje javlja u 34-56% slučajeva, a hiperglikemija u 20-57% slučajeva (LING i sur., 1979; PETERSON, M. E., 1984; REUSCH i FELDMAN, 1991, BENNAIM i sur., 2018). Treba imati na umu da je u ovom istraživanju jedan od pacijenata s hiperglikemijom imao *diabetes mellitus*.

Analiza urina napravljena je u 4/6 pacijenata. Kod sva 4 pacijenta zabilježena je specifična težina mokraće $\leq 1.018-1.020$ (učestalost 100%) što odgovara hiperadrenokorticismu kod kojeg se najčešće javlja specifična težina < 1.020 (ETTINGER i sur., 2017). Autori LING i sur., (1979) opisali su da se specifična težina mokraće manja od 1.015 javlja u čak 60% pasa s hiperadrenokorticismom. U ovom su istraživanju 2/4 psa imala specifičnu težinu mokraće manju od 1.015, što odgovara spoznajama navedenog autora. Hematurija se javila u 100% slučajeva, što je dvostruko više nego su naveli FORRESTER i sur., (1999) u čijem istraživanju je učestalost hematurije bila 50%. Proteinurija i bakterijurija zabilježene su u 2/4 psa (učestalost od 50%). U prethodnim je istraživanjima opisana nešto viša učestalost proteinurije (62-80%) (LING i sur., 1979; HURLEY i VADEN, 1998; BENNAIM i sur., 2018) te učestalost bakterijurije koja odgovara onoj evidentiranoj u ovom istraživanju (10-50%) (LING i sur., 1979; ORTEGA i sur., 1996; FORRESTER i sur., 1999; BENNAIM i sur., 2018). Kod jednog je psa zabilježena i glukozurija, no taj je pas imao konkurentni na inzulin-rezistentni *diabetes mellitus*.

Od komorbiditeta, u ovom je istraživanju jedan pas (16,67%) imao konkurentni slabo regulirani na inzulin rezistentni *diabetes mellitus*. U dva istraživanja navedeno je da 10.5-13.6% pasa s hiperadrenokorticismom ima konkurentni *diabetes mellitus*. (MICELI i sur., 2017, HOFFMAN i sur., 2018). Dijagnostika hiperadrenokorticismu u ovih je pacijenata otežana jer radi o istim simptomima koji se javljaju kod obje bolesti, a slabo regulirani *diabetes mellitus* može dovesti do lažno pozitivnih rezultata adrenalnih funkcijskih testova (ETTINGER i sur., 2017). Kod 2 je pacijenta (učestalost od 33.33%) zabilježen početak pojave mukokele s pojavom gušće žuči u žučnom mjehuru. Takav je nalaz u skladu s istraživanjima u kojima je opisano da je mukokela prisutna u 1.6-23% pasa s hiperadrenokorticismom (KIM i sur., 2017, HOFFMAN i sur., 2018).

U ovom je radu zabilježena veća učestalost adrenokortikalnih tumora desne nadbubrežne žlijezde. Tumor se nalazio na desnoj nadbubrežnoj žlijezdi u 83.3 % slučajeva (n=5), a na lijevoj u 16.67% slučajeva (n=1). Dosad je opisano da adrenokortikalni tumori nemaju tendenciju pojavljivanja na određenoj strani (ETTINGER i sur., 2017), tako da se ovaj nalaz smatra slučajnim te je rezultat malene istraživane skupine.

Od 6 pacijenata s adrenokortikalnim tumorima, kod 2 su pacijenta tumori invadirali krvne žile (učestalost od 33.33%). Takva učestalost odgovara onoj opisanoj u literaturi (9.5-46%) (BARRERA i sur., 2013). Kod jednog je pacijenta, adrenokortikalni karcinom invadio *a. renalis* zbog čega je uz adrenalektomiju učinjena i nefrektomija desnog bubrega. Isto tako, opisana je i veća učestalost uraštanja u venu cavu caudalis kod feokromocitoma (BARRERA i sur., 2013.). To je vidljivo i u ovom istraživanju, obzirom da je pacijent kod kojeg je zabilježeno uraštanje u venu cavu caudalis imao histopatološku dijagnozu feokromocitoma i adrenokortikalnog adenoma na zahvaćenoj nadbubrežnoj žlijezdi.

Od ukupno 3 psa kod kojih je kao funkcijski test odabran test supresije niskom dozom deksametazona, 2 su u rezultatima pokazala izostanak supresije. Taj je uzorak tipičan za hiperadrenokorticizam, te sam po sebi ne omogućuje razlikovanje PDH od adrenokortikalnih tumora. Ono što je vrlo zanimljivo je da je u ovom radu jedan pacijent s adrenokortikalnim tumorom na testu supresije niskom dozom deksametazona pokazao parcijalnu supresiju. Parcijalna supresija podrazumijeva rezultat kod kojeg su koncentracije kortizola 4 i 8 sati nakon aplikacije deksametazona iznad laboratorijski određenih „cut-off” vrijednosti, ali je jedna od njih ili su obje niže od 50% bazalne koncentracije. Takav je uzorak gotovo uvijek konzistentan s PDH te je opisano samo nekoliko slučajeva (NORMAN i sur., 1999) gdje se ovaj uzorak javio u pasa s adrenokortikalnim tumorom. Kod ovog je pacijenta potvrđena dijagnoza adrenokortikalnog karcinoma te dvije godine kasnije i metastaza adrenokortikalnog karcinoma koja se nalazila na jetri. Nije poznato zašto se ovakav uzorak LDDST-a javio kod ovog pacijenta, no na umu treba imati utjecaj neadrenalnih istodobnih bolesti, ali i mogućnost istovremenog PDH.

Za razliku od SANDERS i sur., (2019) koji Utrechtski bodovni sustav nisu primijenili na metastaze, u ovom je radu bodovanje provedeno na jednom uzorku metastaze adrenokortikalnog karcinoma. U odnosu na primarni tumor (adrenokortikalni karcinom) koji je pokazao US od 8.7, na metastazi je izračunat US od 10.8. Naime, uzorak metastaze

pokazao je veći broj Ki67 pozitivnih stanica, što bi moglo govoriti o većoj brzini dijeljenja stanica u odnosu na primarni tumor. U oba je uzorka bila prisutna nekroza te više od 33% vakuoliziranih stanica. Osim u navedenom uzorku primarnog tumora te njegovoj metastazi, nekroza je zabilježena samo u još jednom uzorku. Taj je uzorak bio adrenokortikalni adenom. Stoga se može zaključiti da je nekroza svakako obilježje koje prati agresivnije tumore kao što su karcinomi. Nadalje, u ovom je istraživanju najveći US iznosio 10.8 i on je zabilježen upravo na metastazi adrenokortikalnog karcinoma, što također govori u prilog agresivnosti ovog tumora.

Prilikom ultrazvučne pretrage abdomena, kod svih je pacijenata izmjerena veličina nadbubrežnih žlijezda. Kod svih pacijenata koji su bili uključeni u ovaj diplomski rad debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde bila je veća od 7.4 mm (u prosjeku 1.66 cm), što je u skladu s literaturom u kojoj se navodi da debljina nadbubrežne žlijezde veća od 7.4 mm ukazuje na njeno povećanje (GROOTERS i sur., 1995; BARBARET i sur., 2010). U ovom je istraživanju debljina nadbubrežne žlijezde bila . Debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde u svih pasa ≤ 12 kg bila je veća od 0.62 cm, a kod svih pasa > 12 kg bila je veća od 0.75 cm, što prema BENTO i sur., (2016) ukazuje na povećanje nadbubrežne žlijezde. Nadalje, kod svih je pacijenata debljina kontralateralne nadbubrežne žlijezde bila manja od 5 mm (u prosjeku 3.2 mm), a prema BENCHEKROUN i sur., (2010) debljina manja od 5 mm ukazuje na ADH.

Prema navodima ETTINGER i sur., (2017), adrenalni tumori koji su veći od 2 cm u promjeru te oni koji invadiraju krvne žile vjerojatnije su karcinomi. Premda točan podatak o veličini samog tumora (ne uključujući zdravo tkivo) nemamo, uzorak adrenokortikalnog karcinoma koji je bio uključen u ovo istraživanje imao je zamjetno najveću debljinu zahvaćene nadbubrežne žlijezde. Ista je iznosila 3,6 cm.

U ovom su istraživanju 83.3% adrenokortikalnih tumora činili adenomi, a udio karcinoma bio je 16.7%. Ovakav se nalaz ne slaže s istraživanjem REUSCH i FELDMAN, (1991) koji su utvrdili veću prisutnost adrenokortikalnih karcinoma (63%) u odnosu na adenome. No, u to je istraživanje bio uključen velik broj obdukcijjskih uzoraka, što je moglo dovesti do neželjenog uključivanja prevelikog broja pacijenata s agresivnijim i malignijim tumorima.

Prosječni Ki67 indeks proliferacije u ovom je istraživanju iznosio 3.18 %, što je vrlo slično prosječnom Ki67 indeksu proliferacije utvrđenom od strane SANDERS i sur., 2019 (3.1%). U

ovom je istraživanju u ukupno 3/7 uzoraka nađena nekroza, dok su kod SANDERS i sur., (2019) nekroze nađene u ukupno 20/50 uzoraka. Prisutnost više od 33% stanica s prozirnom/vakuoliziranom citoplazmom evidentirana je u 5/7 uzoraka, dok su je SANDERS i sur., (2019) zabilježili u 32/50 uzoraka. Prosječni zbroj bodova za pacijente prema Utrechtskom bodovnom sustavu ovom je istraživanju iznosio je 7.32 (raspon 2.9-10.8), dok je u navedenom istraživanju iznosio 7.1 (raspon 0.4-29.2).

U prvu skupinu $US < 6$ svrstano je ukupno 3 uzorka, tj. 3 psa, dok je u drugu skupinu s $US \geq 6$ do < 11 svrstano ukupno 4 uzorka (uključujući metastazu adrenokortikalnog karcinoma), tj. 3 psa. U treću skupinu s $US \geq 11$ nije svrstan niti jedan uzorak. Prema tome jednak se broj pacijenata nalazio u skupini 1 i skupini 2. Za razliku od toga kod SANDERS i suradnika, (2019)., najveći je broj pacijenata svrstan u drugu skupinu (n=22), zatim u prvu skupinu (n=17) te najmanje u treću skupinu (n=11).

Od ukupno 6 pacijenata uključenih u ovo istraživanje dva su cenzurirana obzirom da su još uvijek živi. Jedan od njih imao je US 9.7, što ga svrstava u drugu skupinu s umjerenim rizikom za povrat tumora te s prosječnim preživljenjem 51,5 mjesec. Taj je pacijent trenutno živ već 31 mjesec nakon operativnog zahvata. Drugi cenzurirani pacijent imao je US 2.9, što ga svrstava u prvu skupinu US s niskim rizikom za povrat tumora. Osim prethodno navedenog, u prvu US skupinu pripadala su još dva pacijenta (US 4.1 i US. 4.7). Pacijent s US 4.1 preživio je ukupno 72 mjeseca od dana kirurškog zahvata, što je u skladu s njegovom niskom US skupinom. Ovaj je pacijent imao i dijagnozu istodobnog *diabetes mellitus*-a. Pacijent s US 4.7, preživio je mnogo manje od predviđenog vremena određenog njegovom US skupinom, no ovdje se radilo o eutanaziji zbog dijagnoze DCM-a, dakle komorbiditeta. U drugu skupinu pripadali su prethodno naveden cenzurirani pacijent te još 2 (US 8.7 - metastaza 10.8 i US 10.4). Ukupno vrijeme preživljenja kod pacijenta s US 8.7 (adrenokortikalni karcinom) bilo je 24 mjeseca što je značajno manje nego prosječno vrijeme preživljenja predviđeno za ovu skupinu (SANDERS i sur., 2019) od 51.5 mjeseci, no ovaj je pacijent uginuo 1 sat nakon kirurškog zahvata na metastazi. Pacijent s US 10.4 preživio je ukupno 30 mjeseci, što je također manje od predviđenog vremena preživljenja. Kod ovog je pacijenta nastupio arrest pri buđenju iz anestezije pri punkciji tvorbe u prsnom košu. Ta je tvorba bila suspektni tumor na plućima.

Iz prethodno navedenog se može zaključiti da je Utrechtski bodovni sustavdobar bodovni sustav, no na umu treba imati da na vrijeme preživljenja značajno mogu utjecati komorbiditeti.

Naposljetku, po uzoru na istraživanje koje su proveli SANDERS i sur., (2019) napravljena je statistička analiza za provjeru utjecaja kliničkih parametara (parametri vezani uz psa i parametri vezani uz tumor) na samo vrijeme preživljavanja. Za razliku od njihovog istraživanja u ovom radu izostavljeni su sljedeći parametri: promjer tumora (parametar vezan uz tumor) te trajanje kirurškog zahvata i ruptura kapsule (parametri vezani uz kirurški zahvat). Ti su parametri isključeni zbog nedostatka podataka. Umjesto promjera tumora, korištena je debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde. Nakon statističke analize primjenjujući Cox-ov model proporcionalnosti rizika utvrđeno je da niti jedan klinički parametar nije imao statistički značajan utjecaj na vrijeme preživljenja. U referentnom su istraživanju SANDERS i sur., (2019) utvrdili utjecaj promjera tumora na vrijeme preživljenja. Kod tumora < 3 cm prosječno vrijeme preživljenja bilo je 54.7 mjeseci, dok je kod tumora ≥ 3 cm bilo 24.2 mjeseca, a ostali parametri u navedenom istraživanju također nisu pokazali značajan utjecaj na vrijeme preživljenja.

6. ZAKLJUČCI

1. Pasminska predispozicija nije utvrđena kod HAC-a ovisnom o adrenalnom tumoru.
2. Bolest se češće javlja u ženki.
3. Bolest se podjednako javljala u kastriranih i nekastriranih životinja.
4. Bolest se javlja u pasa starijih od 6 godina.
5. Iako neki autori navode češću pojavnost adrenokortikalnih tumora u pasa težih od 20 kilograma, u ovom su istraživanju češće zabilježeni psi tjelesne mase manje od 20 kg.
6. Najčešći simptom hiperadrenokorticisma je PUPD. U ovom je istraživanju zabilježena i visoka učestalost simptoma dahtanja (eng. panting).
7. U pretraženom uzorku najčešće promjene u krvnoj slici bile su neutrofilija i limfopenija. U biokemijskom profilu najčešće su se javile hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija.
8. Najčešći nalaz pri analizi urina bila je specifična težina $\leq 1.018 - 1.020$. Ovo je istraživanje pokazalo nešto veću učestalost hematurije. Od ostalih se promjena često javljaju proteinurija i bakteriurija.
9. Najčešći komorbiditeti koji prate hiperadrenokorticismam su *diabetes mellitus* i mukokela žučnog mjehura.
10. U ovom istraživanju adrenokortikalni tumori pokazali su tendenciju češćeg pojavljivanja na desnoj strani, no zbog malog broja pacijenata ovo se smatra slučajnim nalazom.
11. U ovom je istraživanju zamijećen uzorak parcijalne supresije prilikom testa supresije niskom dozom deksametazona, što je neobičan i rijedak nalaz kod pacijenata s adrenokortikalnim tumorom.
12. U pretraživanom je uzorku najveći US zbroj pokazala metastaza adrenokortikalnog karcinoma. To ide u prilog većoj malignosti karcinoma u odnosu na adenome.
13. Na vrijeme preživljavanja procijenjeno Utrecht score-om utječu i komorbiditeti.
14. Klinički parametri (spol, kastracijski status, tjelesna masa, starost, preoperativno tretiranje hiperkortizolizma, lokacija tumora, venska invazija i debljina zahvaćene nadbubrežne žlijezde) nemaju statistički značajan utjecaj na vrijeme preživljenja.

7. POPIS LITERATURE

1. BARBARET, V., P. PEY, L. DUCHATEAU, A. COMBES, S. DAMINET, J. H. SAUNDERS (2010): Intra- and interobserver variability of ultrasonographic measurements of the adrenal glands in healthy Beagles. *Vet. Radiol. Ultrasound* 51, 656 – 660.
2. BARRERA J. S., F. BERNARD, E. J. EHRHART, S. J. WITHROW, E. MONNET (2013): Evaluation of risk factors for outcome associated with adrenal gland tumors with or without invasion of the caudal vena cava and treated via adrenalectomy in dogs: 86 cases (1993-2009). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242, 1715-1721.
3. BARTHEZ, P. Y., T. G. NYLAND, E. C. FELDMAN (1995): Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 1180-1183.
4. BEHREND, E. N., H. S. KOOISTRA, R. NELSON, C. E. REUSCH, J. C. SCOTT-MONCRIEFF (2013): Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1292-1304.
5. BELLUMORI, T. P., T. R. FAMULA, D. L. BANNASCH, J. M. BELANGER, A. M. OBERBAUER (2013): Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27,254 cases (1995-2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242, 1549-1555.
6. BENCHEKROUN, G., P. DE FORNEL-THIBAUD, M. I. RODRIGUEZ PIÑEIRO, D. RAULT, J. BESSO, A. COHEN, J. HERNANDEZ, F. STAMBOULI, E. GOMES, F. GARNIER, D. BEGON, C. MAUREY-GUENEC, D. ROSENBERG (2010): Ultrasonography criteria for differentiating ACTH dependency from ACTH independency in 47 dogs with hyperadrenocorticism and equivocal asymmetry. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 1077-1085.
7. BENNAIM, M., R. E. SHIEL, C. FORDE, C. T. MOONEY (2018): Evaluation of individual low-dose dexamethasone suppression test patterns in naturally occurring hyperadrenocorticism in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 967-977.
8. BENNAIM, M., R. E. SHIEL, C. T. MOONEY (2019): Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 1: Pathophysiology, aetiology, clinical and clinicopathological features. *Vet. J.* 252: 105342.
9. BENNAIM, M., R. E. SHIEL, C. T. MOONEY (2019): Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 2: Adrenal function testing and differentiating tests. *Vet. J.* 252: 105343.

10. BENTO, P., S. CENTER, J. F. RANDOLPH, A. E. YEAGER (2016): Associations between sex, body weight, age, and ultrasonographically determined adrenal gland thickness in dogs with non-adrenal illness. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 248, 652-660.
11. BEHREND, E.N. (2015): Canine hyperadrenocorticism. U: *Canine and feline endocrinology and reproduction*. (E. C. Feldman, R.W. Nelson, C.E. Reusch, J.C.R.Scott-Moncrieff, E.N. Behrend, Eds.). 4th ed.. Elsevier Saunders. Missouri. pp. 377-451.
12. FORRESTER, S. D., G. C. TROY, M. N. DALTON, J. W. HUFFMAN, G. HOLTZMAN (1999): Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 dogs with hyperadrenocorticism or diabetes mellitus or both. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 557-560.
13. GALAC, S., C. E. REUSCH, H. S. KOOISTRA, A. RIJNBERK (2010): Adrenals. U: *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. (Rijnberk, A., H.S. Kooistra, Eds.). 2nd ed. Schütersche. Hannover. pp. 93-154.
14. GALELLI, M. F., M. F. CABRERA BLATTER, V. CASTILLO (2010): A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and alpha-MSH secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Res. Vet. Sci.* 88, 33-40.
15. GROOTERS, A. M., D. S. BILLER, J. MERRYMAN (1995): Ultrasonographic parameters of normal canine adrenal glands: comparison to necropsy findings. *Vet. Radiol. Ultrasound* 36, 126-130.
16. HERAK-PERKOVIĆ, V. Ž. GRABAREVIĆ, J. KOS (2012): Hiperadrenokorticizam u pasa. U: *Veterinarski priručnik*, 6. Izdanje. Medicinska naklada. Zagreb. pp. 2060-2064.
17. HOFFMAN, J. M., B. N. LOURENÇO, D. E. I. PROMISLOW, K. E. CREEVY (2018): Canine hyperadrenocorticism associations with signalment, selected comorbidities and mortality within North American veterinary teaching hospitals. *J. Small. Anim. Pract.* 59, 681-690.
18. HURLEY, K. J., S. L. VADEN (1998): Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 369-373.
19. JOKINEN, T. S., K. TIIRA, L. METSÄHONKALA, E. H. SEPPÄLÄ, A. HIELM-BJÖRKMAN, H. LOHI, O. LAITINEN-VAPAAVUORI (2015): Behavioral abnormalities in Lagotto Romagnolo dogs with a history of benign familial juvenile epilepsy: a long-term follow-up study. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1081-1087.

20. KASZAK, I., A. RUSZCZAK, S. KANAFKA, K. KACPRZAK, M. KRÓL, P. JURKA (2018): Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta. Vet. Scand.* 60, 66.
21. KIM, K. H., S. M. HAN, K. O. JEON, H. T. KIM, Q. LI, M. O. RYU, W. J. SONG, S. C. PARK, H. Y. YOUN (2017): Clinical relationship between cholestatic disease and pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs: a retrospective case series. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 335-342.
22. LIEN Y.-H., T.-Y. HSIANG, H.-P. HUANG (2010): Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary- and adrenal-dependent hyperadrenocorticism. *Acta. Vet. Scand.* 52, 61.
23. LING, G. V., G. H. STABENFELDT, K. M. COMER, D. H. GRIBBLE, R. D. SCHECHTER (1979): Canine hyperadrenocorticism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 117 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 1211-1215.
24. MICELI, D. D., O. P. PIGNATARO, V. A. CASTILLO (2017): Concurrent hyperadrenocorticism and diabetes mellitus in dogs. *Res. Vet. Sci.* 115, 425-431.
25. NORMAN, E. J., H. THOMPSON, C. T. MOONEY (1999): Dynamic adrenal function testing in eight dogs with hyperadrenocorticism associated with adrenocortical neoplasia. *Vet. Rec.* 144, 551-554.
26. ORTEGA, T. M., E. C. FELDMAN, R. W. NELSON, N. WILLITS, L. D. COWGILL (1996): Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 1724-1729.
27. PÉREZ-ALENZA, D., C. MELIÁN (2017): Hyperadrenocorticism in dogs. U: *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* (Ettinger S.J., E.C.Feldman, E. Cote, Eds.). 8thed. Elsevier Saunders. Missouri. pp. 1795-1811.
28. PETERSON, M. E. (1984): Hyperadrenocorticism. *Vet. Clin. North. Am. Small. Pract.* 14, 731-749.
29. REUSCH, C. E., E. C. FELDMAN (1991): Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 5, 3-10.
30. REUSCH, C. E., S. SCHELLENBERG, M. WENGER (2010): Endocrine hypertension in small animals. *Vet. Clin. North. Am. Small. Pract.* 40, 335-352.
31. SANDERS, K., K. CIRKEL, G. C. M. GRINWIS, E. TESKE, S. A. VAN NIMWEGEN, J. A. MOL, J. W. HESSELINK, H. S. KOOISTRA, S. GALAC (2018): The Utrecht Score: A novel histopathological scoring system to assess the prognosis of dogs with cortisol-secreting adrenocortical tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 17, 329-337

8. SAŽETAK

Određivanje „Utrecht score-a“ i njegova povezanost s kliničkim parametrima te prognozom u pasa s hiperadrenokorticismom ovisnim o nadbubrežnoj žlijezdi

Spontani hiperadrenokorticismam jedna je on najčešćih endokrinoloških bolesti pasa. Hiperadrenokorticismam ovisan o nadbubrežnoj žlijezdi (ADH) rjeđi je oblik ove bolesti, a javlja se u 15-20% slučajeva. Uzrok ovog oblika bolesti su hormonski aktivni adrenokortikalni tumori (adenomi i karcinomi) koji izlučuju kortizol.

Ovo istraživanje obuhvatilo je 6 pasa s ADH-om zaprimljenih na Kliniku za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon dijagnostike koja je obuhvaćala laboratorijske pretrage (kompletna krvna slika, biokemijske pretrage, analiza urina), slikovnu dijagnostiku (ultrazvučna pretraga) i adrenalne funkcijske testove, svim je pacijentima učinjena unilateralna adrenalektomija na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta s ciljem uklanjanja tumora. Uzorci nadbubrenih žlijezda poslani su na Zavod za veterinarsku patologiju gdje je postavljena histopatološka dijagnoza adrenokortikalnog adenoma ili karcinoma. Obzirom da uobičajena histopatološka pretraga nema prognostički značaj, 2019. godine osmišljen je novi histopatološki sustav bodovanja adrenokortikalnih tumora. Utrechtski bodovni sustav temelji se na analizi dvaju histopatoloških parametara i Ki67 indeksa proliferacije te, u skladu s ovim parametrima, formula za njegovo istraživanje je: $Ki67IP + 4$ (ako više od 33% stanica ima prozirnu/vakuoliziranu citoplazmu) + 3 (ako je prisutna nekroza). Svim psima uključenim u ovo istraživanje, izračunat je ukupan zbroj bodova prema Utrechtskom bodovnom sustavu te su s obzirom na to podijeljeni u 3 skupine: ukupan zbroj $US < 6$ (3 psa), ukupan zbroj $US \geq 6$ do < 11 (3 psa) i ukupan zbroj $US \geq 11$ (0 pasa). Prema SANDERS i sur., (2019) veći ukupni zbroj bodova, povezan je s kraćim vremenom preživljenja i s većom mogućnošću za povrat bolesti. Ukupni zbrojevi dobiveni Utrechtskim bodovnim sustavom potom su uspoređeni sa stvarnim vremenom preživljenja u ovom istraživanju.

Ultrazvučnom pretragom abdomena procijenjena je veličina zahvaćene nadbubrežne žlijezde, veličina kontralateralne nadbubrežne žlijezde te je zabilježena venska invazija tumorom (ako je bila prisutna). Pri procjeni veličine nadbubrežnih žlijezda najkorisnija je bila debljina

nadbubrežne žlijezde (dorzoventralna dimenzija). Zaključeno je da veličina kontralateralne žlijezde manja od 5 mm ukazuje na adrenokortikalni tumor te je dobra metoda za razlikovanje PDH od ADH. Debljina nadbubrežne žlijezde u zdravih pasa ≤ 12 kg ne bi smjela biti veća od 0.62 cm, niti veća od 0.75 cm u pasa > 12 kg, a debljina veća od 7.4 mm dokaz je povećanja nadbubrežne žlijezde. Venska invazija zabilježena je u 2 psa, a pojačana učestalost tumorske venske invazije zabilježena je kod malignijih tumora (adrenokortikalnih karcinoma) te feokromocitoma.

Klinički parametri (spol, kastracijski status, starost, tjelesna masa, preoperativno tretiranje hiperkortizolizma, lokacija tumora, venska invazija i debljina nadbubrežne žlijezde) nisu pokazali statistički značajan utjecaj na vrijeme preživljenja.

Ključne riječi: pas, hiperadrenokorticism, Cushingova bolest, adrenokortikalni tumor
Utrechtski bodovni sustav

9. SUMMARY

Determination of Utrecht score and its correlation with clinical parameters and prognosis in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism

Spontaneous hyperadrenocorticism is one of the most common endocrine diseases in dogs. Adrenal-dependent hyperadrenocorticism (ADH) is a rarer form of the disease, occurring in 15-20% of cases. The cause of this form of the disease are hormonally active adrenocortical tumors (adenomas and carcinomas) that secrete cortisol.

In this study 6 dogs were included with adrenal-dependent hyperadrenocorticism (ADH) admitted to the Internal Medicine Clinic at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Upon the completion of diagnostics that included: laboratory tests (complete blood count, biochemical tests, urine analysis), diagnostic imaging (ultrasound) and adrenal function tests, all patients underwent unilateral adrenalectomy at the Clinic of Surgery, Orthopedics and Ophthalmology at the Faculty of Veterinary Medicine with the aim to remove the tumor. Adrenal gland samples were sent to the Department of Veterinary Pathology where a histopathological diagnosis of adrenocortical adenoma or carcinoma was made. Since the usual histopathological examination had no prognostic significance, in 2019 a new histopathological scoring system for adrenocortical tumors was designed: The Utrecht scoring system, based on the analysis of two histopathological parameters and the Ki67 proliferation index and its formula consists of these parameters: $Ki67IP + 4$ (if more than 33% of cells have clear/vacuolated cytoplasm) + 3 (if necrosis is present). For all dogs included in this study, the total score was calculated according to the Utrecht Score (US) and they were therefore divided into 3 groups: total US <6 (3 dogs), total US ≥ 6 to <11 (3 dogs) and total US ≥ 11 (0 dogs). According to SANDERS et al., (2019), a higher total score is associated with a shorter survival time and a greater chance of recurrence of hyperadrenocorticism. All obtained Utrecht scores were then compared with the actual survival time in this research.

Ultrasound examination of the abdomen was used to assess the size of the affected adrenal gland, the size of the contralateral adrenal gland, and tumor venous invasion (if present). In estimating the size of the adrenal glands, adrenal gland thickness (dorsoventral dimension) was most useful. It was concluded that the size of the contralateral gland less than 5 mm

indicates an adrenocortical tumor and is a good method to distinguish PDH from ADH. Adrenal gland thickness in healthy dogs should not exceed 0.62 cm in dogs \leq 12 kg and greater than 0.75 cm in dogs $>$ 12 kg, and thickness greater than 7.4 mm is evidence of adrenal gland enlargement. Venous invasion was observed in 2 dogs, and an increased incidence of tumor venous invasion was observed in malignant tumors (adrenocortical carcinomas) and pheochromocytomas.

Clinical parameters (sex, neuter status, age, body weight, preoperative use of medical treatment, tumor location, venous invasion, and adrenal thickness) did not show statistically significant effect on survival time.

Keywords: dog; hyperadrenocorticism; Cushing's disease; adrenocortical tumor; Utrecht score

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11.03.1997. u Zagrebu. Nakon završene Opće Gimnazije Velika Gorica, 2015. godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Istovremeno s osnovnom i srednjom školom, završila sam i Umjetničku školu Franje Lučića u Velikoj Gorici te stekla titulu profesionalnog scenskog plesača s posebnim kompetencijama u baletu i suvremenom plesu.

Tijekom studiranja bila sam uključena u studentske udruge IVSA i USVM. U sklopu IVSA-e sudjelovala sam u organizaciji 68. IVSA kongresa, za što je kolegama i meni dodijeljena Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici. Kao članica IVSA-e od 2018.-2019. godine bila sam mlada ambasadorica organizacije OIE (World Organisation for Animal Health).

Od listopada 2018. godine volontiram na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a od 2019. demonstratorica sam na predmetima Klinička propedeutika i Unutarnje bolesti.

Stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj ambulanti za male životinje „Buba“, a sudjelovala sam i na jednomjesečnoj praksi u sklopu CEEPUS programa na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani. Godine 2019. sudjelovala sam na trodnevnom Internacionalnom simpoziju o divljim životinjama koji se održao u Južnoafričkoj Republici.

Za vrijeme studija sudjelovala sam i na brojnim dodatnim edukacijama i kongresima kao što su: Endocrinology course (OKEAN Veterinary training system), Eastern European Regional Veterinary Conference, Veterinary Seminar of Small Animal Practice, 5th and 6th Congress of Small Animal Veterinary Practice, Congress Veterinary Science and Profession, 68th IVSA Congress i European Veterinary Students Seminar.