

## Sammanfattning

Hypofysberoende hyperadrenokorticism (HHA), eller Cushings sjukdom, är en vanlig sjukdom hos medelålders till äldre hundar, som orsakas av en adrenokortikotrop hormon (ACTH)-producerande tumör (kortikotrop adenom) i hypofysen (nedre hjärnbihaget).<sup>9</sup> ACTH verkar på binjurarna, vilka stimuleras till en ökad produktion och utsöndring av stresshormonet kortisol. Därför uppvisar hundar med HHA kliniska tecken på hyperkortisolism, till exempel ökad urinavgång (polyuri), ökad törst (polydipsi), ökad aptit (polyfagi), ökat buk-omfång, håravfall, tunn och skör hud, muskelförtvining och nedsatt uthållighet. Dessutom kan hundarna uppvisa centralnervösa symtom orsakade av en direkt tryckeffekt från hypofystumören.<sup>2,9</sup> De vanligaste medicinska behandlingarna (dvs mitotan och trilostan) utövar sina effekter på binjurarna,<sup>6,7</sup> där de minskar kortisolproduktionen. Den primära orsaken, dvs. hypofystumören kvarstår dock. Med syfte att rikta behandlingen mot hypofystumören har en kirurgisk teknik (transsfenoidal hypofysektomi) tillämpats i Nederländerna sedan 1993.<sup>4,5</sup> Det är inte känt, vad som orsakar kortikotropa adenom, inte heller vet man varför det är så vanligt förekommande hos hund (**Kapitel 2**).

Studierna i denna avhandling har haft två övergripande mål (**Kapitel 1**): (1) att göra en uppföljande långtidsstudie av hundar som genomgått hypofysektomi vad gäller överlevnad, återfall och prognostiska faktorer; (2) att utföra molekylärbiologiska studier i ett försök att klarlägga de kortikotropa adenomens patogenes.

Resultatet från en uppföljande studie av 150 opererade hundar med HHA, som sträckte sig över 10 år, konfirmerade att hypofysektomi är en effektiv behandlingsmetod i händerna på en skicklig neurokirurg (**Kapitel 3**). Till komplikationerna hör postoperativ mortalitet, persisterande hyperadrenokorticism, återfall, central diabetes insipidus och keratokonjunktivitis sicca. Hundar med HHA och en förstörd hypofys har kortare livslängd, kortare återfallsfri period, samt löper större risk att utveckla persisterande central diabetes mellitus.

Med regressionsanalys av preoperativt tillgängliga parametrar för 181 behandlade hundar, kunde prediktiva faktorer för överlevnad och återfall identifieras (**Kapitel 4**). Till exempel löper äldre hundar och hundar med hög plasma koncentration av ACTH en högre risk för HHA-relaterad mortalitet. En förstörd hypofys, tjockt sfenoidben, hög preoperativ urin kortikoid/kreatinin ratio (UCCR) och hög plasma koncentration av  $\alpha$ -melanocyt-stimulerande hormon ( $\alpha$ -MSH) är förenat med en ökad återfallsfrekvens.

Efter hypofysektomi finns det ofta mikroskopiska öar av kvarsittande funktionerande kortikotropa celler. Hos hundar med HHA är det av intresse att kunna differentiera mellan kvarsittande normala och tumörformade celler. I en studie av pulsativ variation i plasmakoncentrationerna av ACTH, kortisol,  $\alpha$ -MSH och GH före och efter hypofysektomi var 6-8 veckor postoperativ pulsativ variation av plasma ACTH-koncentration förenad med ökad riks för återfall (**Kapitel 5**).

Studier av pulsativa variationer av plasma koncentrationer av hormon är både arbetskrävande och kostsamt. I en mer praktiskt uppsättning analyserades värdet av en direkt mätning av plasmakoncentration av ACTH, kortisol,  $\alpha$ -MSH och GH under de 4 första timmarna efter operationen hos 51 opererade hundar med HHA. Preoperativ plasma  $\alpha$ -MSH koncentration och postoperativ plasma ACTH, kortisol och  $\alpha$ -MSH var prediktiva för återfall (**Kapitel 6**).

Sammanfattningsvis studierna i avhandlingens första del bidragit med värdefull information om effektiviteten av transsfenoidal hypofysektomi som behandling av HHA hos

hund. Cirka 85% av hundarna blir initialt botade. Dock återkommer symtom på hyperadrenokorticism i 25% av fallen. Preoperativ mätning av plasma  $\alpha$ -MSH och ACTH koncentration och UCCR samt visualisering av hypofysen och omgivande strukturer kan ge prognostisk information om det kirurgiska utfallet, i fråga om postoperativa komplikationer och återfallsrisk. Direkt postoperativ analys av plasma koncentration av  $\alpha$ -MSH, ACTH och kortisol samt analys av UCCR 8 veckor efter operation är användbara parametrar för att utvärdera det kirurgiska utfallet också på längre sikt. Det är dock inte möjligt att förutspå samtliga återfall. Därför är genomförandet av regelbundna postoperativa kontroller av stor betydelse. Även fortsatta studier av pre- och postoperativa kliniska utvärderingar och behandlingar är av intresse för att ytterligare förbättra behandlingsresultaten. Som en direkt följd av dessa resultat har en intraoperativ endoskopisk efterkontroll introducerats för att minska återfallsfrekvensen hos hundar med ett tjockt sfenoid ben.

I avhandlingens andra del fokuseras faktorer (Tbx19-Tpit, NeuroD1, LIF-LIFR), som främjar den normala differentieringen av kortikotropa celler under fosterutvecklingen<sup>3,8,11</sup>. I hypofysen är Tbx19 specifik för ACTH och  $\alpha$ -MSH producerande celler.<sup>3</sup> Den kompletta, koderande cDNA-sekvensen på hund fastställdes och en mutationsanalys genomfördes på tumörmaterial från 14 kortikotropa adenom. Ingen tumörspecifik mutation hittades. Intressant nog upptäcktes en missens polymorfism i en mycket välkonserverad DNA-bindande domän (T-boxen), med en allelfrekvens på 25% inom Berner Sennen hundar. Hur denna polymorfism påverkar Tbx19s funktion är okänt (**Kapitel 7**).

NeuroD1 är inte uttryckt i melanotropa celler hos mus. Detta fynd konfirmerades hos hund med kvantitativ qPCR analys. Uttrycket av NeuroD1 i *pars distalis adenohipofysis* och var signifikant högre än det i neurointermediärloben (**Kapitel 8**). Det var en skillnad mellan NeuroD1s uttryck mellan olika kortikotropa adenom, vilket kan komma att bli användbart för att dela in dem i olika subgrupper.

En sekvens- och mutationsanalys av den koderande sekvensen av LIFR hos hund genomfördes, men inte heller här påträffades några mutationer. Däremot kunde en stark coexpression av LIFR och ACTH samt  $\alpha$ -MSH påvisas (**Kapitel 9**). Kronisk aktivering av LIFR skulle hypotetiskt kunna vara involverad i patogenesen av HHA hos hund. Trots det starka uttrycket av LIFR i intermediärloben, var uttrycket av LIF förvånande lågt. Detta fynd indikerar att LIFR kan mediera en icke-neural signaleringsväg för stimulering av  $\alpha$ -MSH sekretion från intermediärloben. Detta är särskilt intressant med tanke på  $\alpha$ -MSHs, på senare år uppmärksammade, direkta antiinflammatoriska verkan.<sup>1,10</sup> LIFR var utesluten som orsakande faktor för hypofysär dvärgväxt hos Schäfer (**Kapitel 10**).

Sammanfattningsvis har studierna i avhandlingens andra del bekräftat användandet av Tbx19/Tpit som en markör för ACTH- och  $\alpha$ -MSH producerande celler hos hund. Dessa celler uppvisar också starkt uttryck av LIFR men uttrycket av NeuroD1 är olika. Fortsatta studier av cytokinförekomst och dess reglering av hormonsekretionen i hypofysen och i intermediärloben i synnerhet, skulle vara mycket intressant, liksom studier av NeuroD1 som möjlig markör för tumörer härrörande från kortikotropa celler.

## Konklusioner

### *Del II Patobiologi av hypofysfunktion efter transfenoidal hypofysektomi på hundar med hypofysberoende hyperadrenokorticism*

- ▶ Transsfenoidal hypofysektomi är en effektiv behandling för hypofysberoende hyperadrenokorticism hos hund
- ▶ Överlevnad och återfallsfri period efter hypofysektomi minskar och incidensen av central diabetes insipidus ökar med ökad hypofysstorlek
- ▶ Hypofysens storlek, sfenoidbenets tjocklek, plasma  $\alpha$ -MSH koncentration och kortisolekretion i urinen preoperativt fungerar som prediktiva faktorer för återfall efter operation
- ▶ Förekomst av postoperativa pulsativa förändringar av plasma ACTH koncentrationen efter hypofysektomi är en riskfaktor för återfall av HHA.
- ▶ Tidig postoperativ analys av plasmaprofiler av ACTH kan förutsäga återfall av hyperadrenokorticism efter hypofysektomi

### *Del II Onkogenes av kortikotropa hypofysadenom hos hund*

- ▶ Tbx 19-Tpit kan användas som en markör för ACTH och  $\alpha$ -MSH producerande celler hos hund. Det är inte troligt att mutationer i Tbx19-Tpit är av avgörande betydelse i de kortikotropa adenomens patogenes
- ▶ NeuroD1 är i huvudsak uttryckt i pars distalis adenohipofysis och uttrycket är lågt i intermediärloben.
- ▶ Det råder en stark coexpression av LIFR och ACTH och  $\alpha$ -MSH i hundens hypofys. Våra fynd tillsammans med fynd gjorda av andra, indikerar att LIFR kan vara en viktig faktor för kortikotropa adenom hos hund.
- ▶ LIFR är inte involverad i patogenesen av hypofysär dvärgväxt hos Schäfer.

## Referenser

1. Catania A, Airaghi L, Colombo G, Lipton JM: Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. *Trends Endocrinol Metab* 11:304-308, 2000
2. Hanson J: Hyperadrenokorticism hos hund - en litteraturstudie, del 1 och 2. *Svensk Veterinärtidning* 54:401-415, 2002
3. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J: A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859, 2001
4. Meij B, Voorhout G, Rijnberk A: Progress in transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs and cats. *Mol Cell Endocrinol* 197:89-96, 2002
5. Meij BP, Voorhout G, van den Ingh TSGAM, Hazewinkel HAW, Teske E, Rijnberk A: Results of transsphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Vet Surg* 27:246-261, 1998
6. Nelson AA, Woodard G: Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Archives of pathology* 48:387-394, 1948
7. Potts GO, Creange JE, Hardomg HR, Schane HP: Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids* 32:257-267, 1978
8. Poulin G, Lebel M, Chamberland M, Paradis FW, Drouin J: Specific protein-protein interaction between basic helix-loop-helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol* 20:4826-4837, 2000
9. Rijnberk A: Hypothalamus-pituitary system, in Rijnberk A (ed): *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996, pp 11-34
10. Starowicz K, Przewlocka B: The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci* 73:823-847, 2003
11. Yano H, Readhead C, Nakashima M, Ren SG, Melmed S: Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol* 12:1708-1720, 1998