



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap  
Institutt for sports- og familiedyrmedisin  
Seksjon for smådyrsykdommer

Fordypningsoppgave 2015, 15 stp  
Fordypnings-/prosjektretning

# **Mikrometastaser i lunge ved osteosarkom hos hund: Immunhistokjemisk påvisning med TP-3 – et osteosarkom-spesifikt antistoff hos menneske**

Canine osteosarcoma: Immunohistochemical staining with  
TP-3 as a detection method for pulmonary micrometastasis

Anne Høifødt Nornes og Sara Marlene Solheim  
Kull 2010

Veiledere: Professorene Lars Moe og Erling Olaf Koppang



## Innhold

Forord.....	4
Sammendrag.....	5
Innledning .....	7
Definisjoner.....	<a href="#">9</a>
Osteosarkom hos hund .....	12
Kreftutvikling og metastasering.....	20
Påvisningsmetoder .....	30
Behandling av osteosarkom hos hund.....	34
Hund som modellorganisme for mennsker .....	37
Fargemetoder.....	40
Materiale og metoder .....	41
Resultater.....	50
Diskusjon .....	52
Konklusjon .....	56
Takk til bidragsyttere .....	57
Summary .....	58
Referanser .....	59
Vedlegg .....	65

## **Forord**

Kreftforskning er et stort og meget interessant fagfelt i stadig vekst.

Sykdomsgruppen svært aktuell både for leger og veterinærer, og mulighetene for tverrfaglig utbytte og samarbeid er store. Hunder og mennesker deler mange viktige former for kreft, og ved å lære noe nytt eller løse et problem hos den ene arten, vil man ofte også kunne hjelpe den andre.

Immunhistokjemi er en av mange metoder som kan brukes til å påvise kreftceller i et vev. I vår studie benytter vi oss av metoden og et antistoff utviklet til human bruk for å lete etter kreftceller i lungene hos hund. Vi ser på dette som en spennende mulighet til å få et innblikk i kreftforskning og metoder for påvisning av spredning på cellenivå. Vi håper at våre resultater kan være relevante for andre, både i klinikk og videre forskning.

## Sammendrag

*Tittel:* Osteosarkom hos hund: TP-3 som påvisningsmetode for mikrometastaser i lunge

*Forfattere:* Anne H. Nornes og Sara M Solheim

*Veileder:* Lars Moe ved Institutt for sports- og familiedyrmedisin og Erling Olaf Koppang ved Institutt for basalfag og akvamedisin.

Osteosarkom er en malign aggressiv beintumor, og er den vanligste primære beintumoren hos hund. Denne aggressive kreftformen metastaserer lett til lungene, og trolig har mange metastaser her allerede ved diagnosetidspunktet. Vi ønsket å undersøke om det er mulig å detektere mikrometastaser i lungevevet hos hunder avlivet ved diagnosetidspunktet. Samtidig ville vi sette oss inn i osteosarkom som sykdom og dens spredning til lunger. I pilotprosjektet undersøkte vi om antistoffet TP-3 kunne brukes som en markør for metastatiske celler i lunger. Vi undersøkte lunger fra tre hunder: hund 1: påvist osteosarkom med detekterbare metastaser i lunger. Hund 2: påvist osteosarkom uten detekterbare makroskopiske metastaser i lunger. Hund 3: kontrollhund uten påvist kreftsykdom. Vi benyttet TP-3 i konsentrasjonene 1:50 og 1:100. Det ble også laget noen kontrollsnitt uten TP-3 antistoff. Det ble prøvd ut tre ulike demaskeringsmetoder, hvor det ut fra disse resultatene ble valgt å bruke TrisEDTA. Det ble sett mere overfarging av vevssnittene ved bruk av 1:50 konsentrasjon enn ved 1:100. Det ble sett både spesifikk og uspesifikk TP-3 farging hos alle de tre hundene, men mere spesifikt hos de to med påvist osteosarkom. Årsaken til at kontrollhunden også har enkelte celler

som farger tilsynelatende spesifikt er uviss og et større forsøk må gjøres for å si noe om dette.

## **Innledning**

### ***Bakgrunn***

Osteosarkom (OSA) er en malign aggressiv beintumor, og er den vanligste primære beintumoren hos hund. Tumoren ødelegger beinet lokalt og vokser inn i omkringliggende bløtvev. Kreftformen har en høy metastaseringsgrad, og spres raskt med blodet til andre organer (1). Den vanligste lokalisasjonen for slike metastaser er lungene (2).

Tumoren oppstår først og fremst hos store raser og gigantraser. Oftest rammes hunder i alderen 7-9 år, men man ser også en liten ansamling hos hunder i alderen 18-24 måneder (1). Årsaken til at osteosarkom oppstår er ukjent. Genetiske faktorer, mikrotraumer, stråling, osteomyelitter og hormonell påvirkning er antatt å være medvirkende årsaksfaktorer (1).

Hunden er brukt som modell innen medisinsk forskning på osteosarkom, da sykdommen forekommer 10 ganger hyppigere hos hunder enn hos mennesker (3). Insidensraten hos menneske er 1-3 tilfeller per million individer årlig, der 70-75 % av pasientene er mellom 10 og 25 år (3). Hos både mennesker og hunder er dødsårsaken ved osteosarkom knyttet til lungemetastaser. Til tross for nye behandlingsmetoder er dødeligheten ved osteosarkom 30-40 % etter 5 år hos menneske. Hos hund er dødeligheten hele 90 % (3).

Bare 15 % av hundene har radiologisk påviselige metastaser ved diagnosetidspunktet, men hele 85-90 % av hundene vil utvikle makroskopiske metastaser etter 6-9 mnd, til tross for behandling av primærsvulsten. At så mange

pasienter likevel utvikler metastaser indikerer at metastaseringen skjer på et tidlig tidspunkt i sykdomsforløpet, og at det antakelig allerede finnes subkliniske mikrometastaser i lungevevet eller andre steder i kroppen når primærtumoren behandles (3). Denne fasen hos de metastaserende cellene vet man lite om. Hos menneske er det sett at disse cellene antakelig løsner fra primærtumor på et tidlig tidspunkt. De er for eksempel påvist i sirkulasjon og i beinmarg på tidlige stadier av sykdommen (4).

Lungemetastaser er ikke synlig på røntgen før de er mer enn 5 mm i diameter (5). I tidlige stadier er heller ikke metastasene synlige makroskopisk ved obduksjon, og ofte heller ikke ved konvensjonell histologisk undersøkelse med Hematoxylin-Eosin (HE)-farging.

I denne studien ønsker vi å studere lunger fra hund på diagnosetidspunktet, for å undersøke om det allerede da finnes kreftceller i lungevevet. Vi skal teste en immunhistokjemisk fargemetode på formalinsnitt for å se om metoden kan benyttes til å påvise mikrometastaser før de er synlige med andre påvisningsmetoder. Hvis metoden fungerer vil den kunne brukes til å undersøke hvor kreftcellene befinner seg i lungevevet i tidlige stadier, noe som igjen kan si oss noe om metastaseringsveien og -tidspunktet.



## Definisjoner

**Aksialt skjelett:** Virvelsøylen, brystkassen og bekkenet, i kontrast til det appendikulære skjelett som omfatter ekstremitetene.

**Angiogenese:** Dannelse av nye blodkar.

**Apoptose:** Celledød induert av cellen selv.

**Autokrin signalering:** Selv-signalering, der en celle responderer på sitt eget signal.

**CAMs:** Celle adhesjons molekyler. Binder celler til hverandre og til ECM.

**Chondroblastiske osteosarkom:** Osteosarkomer som lager chondroid matrix (brusk).

**CT:** Computertomografi, avansert bildediagnostisk metode der mange røntgenbilder gir muligheten til å undersøke et interessant område i flere plan.

**ECM:** Ekstracellulær matriks.

**EMT:** Epitelialt- mesenkymalt skift. Overgangen fra epitelial til mesenkymal celletype.

**FGF1 og 2:** Fibroblast vekstfaktorer.

**GH:** Veksthormon (growth hormone), peptidhormon som stimulerer vekst og celledeling.

**Gigantraser:** Ikke en strengt definert gruppe, men et ofte brukt begrep om de største hundrasene som veier over 45-50 kg. De fleste mastiffer, Dogue de Bordeaux, Grand Danois, Pyreneer, Irsk ulvehund, Leonberger, Newfoundland, St. Bernard og Skotsk hjortehund regnes for å være gigantraser.

**HGF-1:** Hepatocyte growth factor, se MET.

**HER-2:** Human epidermal vekstfaktor-reseptor-2, aktivering gir celletransformasjon og cellevekst.

**Immunhistokjemi:** Immunologisk teknikk på vevssnitt, der man kan påvise spesifikke stoffer i cellen ved å bruke et antistoff som fester seg til dette stoffets antigen. Brukes mye i diagnostikk og medisinsk forskning.(9).

**Integriner:** Adhesjonsmolekyler som forankrer celler til ECM (12).

**Interfase:** Fasen i cellyklusen hvor cellen vokser seg større, består av stadiene: G1, G2 og S (13).

**Kapillærer:** Kroppens tynneste blodårer, sørger for ernæring og gassutveksling i vevet

**Kjemotaksis:** Vandring av celler.

**Kreft :** En neoplasi er en vekstforstyrrelse, en ny vekst av celler som vokser unormalt i forhold til den vanlige vekst og utvikling i organet og uavhengig av kroppens vanlige reguleringsmekanismer (6).

**Mesenchymal:** vev karakterisert av løst organiserte celler uten polaritet i en ekstracellulært matriks. Benvev er et mesenchymalt vev som har oppstått fra embryoets mesoderm.

**MET:** c-MET er et proto-onkogen som koder for en tyrosin kinase-reseptor der HGF-1 er ligand. Styret mange celledfunksjoner, blant annet proliferasjon. Dysregulering er vist å ha tumorigen effekt.

**Metastase:** Dattersvulst fra en kreftsvulst. Løsrevne kreftceller kan dele seg og gi opphav til nye kolonier av kreftceller utenfor den opprinnelige svulsten (8).

**Mitogen:** Noe som fremmer celledeling (mitose).

**Mitose:** Celledeling består av 4 stadier: G1, G2, S, og M.

**Mitose-fasen:** Selve delingen i celledyklusen, M stadiet (13).

**Mitoseindex:** En gradering som anger gjennomsnittlig antall mitoser per synsfelt ved stor forstørrelse. Brukes som et parameter for malignitet (10).

**mTOR:** "mechanistic target of rapamycin" en serin/threonin proteinkinase som regulerer en rekke prosesser i cellen; vekst, proliferasjon, motilitet overlevelse, proteinsyntese, autofagi og transkripsjon.

**Onkogener:** Et gen som har potensiale til å forårsake til kreft.

**Osteoblast:** En bendannende celle som produserer osteoid i knokkelen. Ligger først på overflaten av benet, når de så blir omsluttet av benmatriks blir de osteocytter.

**Osteosarkom (OSA) :** Osteosarkom, kreftsvulst i benvev og som utgår fra bendannende celler (osteoblaster) (7).

**Pathway:** Signaleringsvei i en celle eller mellom celler, for å styre og koordinere aktivitet.

**PGFR:** Platederivert vekstfaktor-reseptor.

**Proto-onkogen:** Et normalt gen som kan mutere til et onkogen.

**PTEN:** Fosfatase- og tensinhomolog, et tumor supressor-gen. Det er mistanke om at PTEN-dysfunksjon er involvert i patogenesen ved OSA.

**RB:** Retinoblastoma-1 er et gen med tumor supressor-effekt; RB1-proteinet inhiberer blant annet cellyklus frem til cellen er klar til deling. Det er sett RB-dysfunksjon i flere kreftformer.

**Telangiectatic osteosarkom:** Histologisk subtype av osteosarkom med blodfylte og nekrotiske hulrom.

**Tip celler:** Migrerende celler som ikke prolifererer men som invaderer nærliggende vev under angiogenesen (11).

**TP53:** Også kalt p53, et tumor-supressorgen som normalt er med og styre induksjon av apoptose, DNA-reparasjon og inhibering av angiogenese.

**Trk:** Tropomyosin-relatert kinase reseptorer, reseptor for Nevronal vekstfaktor NGF-1.

**Tumorgrad:** Patologisk gradering av en tumor fra 1-5 avhengig av malignitet.

**Tumorsuppressorgen:** Gen som beskytter cellen mot ukontrollert celledeling. P53 er et slik gen.

**VEGF:** Vaskulære endoteliale vekstfaktorer.

## Oversikt over osteosarkom

### Kliniske og epidemiologiske karakteristika

#### *Primærtumor: Lokalisering*

Den absolutt vanligste lokalisasjon for tumoren er i lange knokler, over 75% av osteosarkomene oppstår her. 24% oppstår i det aksiale skjelettet, og 1% oppstår i bløtvev (1). I de lange knoklene oppstår tumoren oftest i metafysene. Frambein er dobbelt så ofte rammet som bakbeina. Distale radius og proximale humerus er de to vanligste lokalisasjonene (2). På bakbeina er distale femur, proksimale tibia og distale tibia de vanligste lokalisasjonene. Andre lokalisasjoner som proksimale femur, patella, midt-radius, ulna eller distalt på lemmene er mindre vanlige (5). Hos de mindre hundrasene oppstår osteosarkomer oftere i det aksiale skjelettet (3:1) sammenliknet med osteosarkom hos de store raserene. Vanlige aksiale lokasjoner for osteosarkom er ribbein, maxilla og mandibel. Mindre vanlig er osteosarkom i vertebrae, sternum, bekken og skalle (5). Det finnes også en sjelden form for osteosarkom som oppstår utenfor beinvev.

Tumoren ekspanderer først i endostale områder, men vil etter hvert som den vokser trenge seg gjennom cortex og inn i omkringliggende bløtvev. Osteosarkom krysser sjeldent ledd, ettersom leddoverflater dekket med brusk vil danne en naturlig barriere mot den ekspanderende svulsten (5).

Når det kommer til alder ved sykdommen ser man en todelt fordeling. Osteosarkom oppstår først og fremst hos hunder i alderen 7-9år, men man har også en forekomst av hunder i alderen 18-24 måneder (1). Kastrerte hunder har ifølge en studie dobbelt så stor sannsynlighet til å utvikle osteosarkom sammenliknet med intakte hunder. Dette gjelder både for tisper og hannhunder (14).

## ***Etiologi***

Årsaken til at osteosarkom oppstår er ukjent, men mange årsaksfaktorer er trolig medvirkende, blant annet genetiske variasjoner, stråling, metallimplantater, virus, osteomyelitt, frakturer, repetitiv mikrotraume, hormoner og økt osteoblastaktivitet. Man tror blant annet at spesifikke gener hos St. Bernardshunder påvirker sannsynligheten for å utvikle osteosarkom (5).

## ***Størrelse***

Det er i hovedsak store raser og gigantraser som utvikler osteosarkom. Gigantraser har faktisk 61 ganger økt risiko for osteosarkom sammenliknet med den generelle OSA-risikoen i hundepopulasjonen (15), og kun 5 % av osteosarkomtilfeller rammer hunder under 15 kg(1). For hunder med en kroppsvekt over 36 kg er risikoen for osteosarkom hele 185 ganger større enn risikoen for hunder under 9 kilo (16). En teori går ut på at høyre vekt og følgelig større stress på sensitive celler i fyseområdet, som så vil begynne å proliferere og på sikt gi osteosarkom, men dette er foreløpig ikke bekreftet (17).

Hannhunder er antatt å rammes oftere enn tisper, med en ratio på 1,5:1, men ikke alle publikasjoner har dette som konsistent funn. Rammede tisper er primært av rasene Grand Danois, St. Bernard og Rottweiler (1).

## ***Genetikk***

Man har sterke indikasjoner på at genetiske faktorer spiller inn i risikoen for osteosarkom hos både mennesker og hunder. Den mest kjente mutasjonen ved OSA hos hund er i tumor-supressorgenet p53, der missense- eller punktmutasjoner gir et defekt eller overuttrykt gen hos 60 % av cellelinjene. Et annet tumor supressorgen som antakelig bidrar i tumorpatogenesisen er RB som koder for retinoblastomprotein. Dette er vist å være dysregulert ved osteosarkom hos hund og flere andre krefttyper. Fosfatase- og tensinhomolog PTEN er et annet tumor supressor-gen man mistenker at er involvert i patogenesisen ved OSA. Genet er ofte tapt ved delesjon (17).

Det ser ut til at noe hunderaser har en rase-assosiert arvelighet for osteosarkom. Hos Skotsk hjortehund er forekomsten av osteosarkom 150 tilfeller per 1000 hunder - sammenliknet med 7 tilfeller per 100,000 hunder i den generelle hundepopulasjonen (18). Med en beregnet arvelighet på 0,69 betyr dette at hele 69 % av tilfellene skyldes arvelige faktorer. Man har antatt at dette var et dominant gen. Ny forskning har funnet at locuset OSA1 på kromosom 34 har med utvikling av osteosarkom å gjøre hos denne rasen. Dette området er syntenisk med et område på menneskets kromosom 3 (17).

Rasespesifikk insidens for Rottweiler er 12,6 %, og også hos denne rasen er det mistanke om en sterk genetisk factor (19). Det er gjort en studie på to kohorter med hhv Rottweilere og Golden Retrievere med osteosarkom, der man fant tydelige forskjeller i hvilke typer mutasjoner hundene av de ulike rasene hadde. Dette kan tyde på at det foreligger spesifikke arvelige risikofaktorer hos rasene (20).

### ***Molekylære faktorer***

Dysregulering av pathways og andre endringer som gjør at kreftcellene overlever er nøkkelen til hvordan osteosarkomer og andre kreftformer kan oppstå, vokse og spre seg. Siden osteosarkomer er svært heterogene og kaotiske av natur, har det vært vanskelig å beskrive spesifikke molekulære forstyrrelser, men man kjenner nå til noen.

MET er et proto-onkogen som koder for en reseptor, som ved ligering med HGF-1 hepatocyte growth factor kan styre mange cellefunksjoner, blant annet proliferasjon. Overdreven eller dysregulert MET/HGF-signalering har en tumorigen effekt, og er sett hos osteosarkomceller i flere studier (21).

Effekten av veksthormon (GH) reguleres blant annet av IGF-1. Hos osteoblaster vil denne vekstfaktoren fremme mitogenesen og hindre apoptose, og også fremme kardannelse. Dette er verdifulle egenskaper for en kreftcelle. Det er sett økt IGF-1 aktivitet i osteosarkom-cellelinjer i eksperimentelle og prekliniske studier, men

forsøk med somatostatin-analoger som skal hemme IGF-1's effekt har ikke vist å ha effekt ved behandling av hunder med osteosarkom (17).

erbB-2 er et proto-onkogen som koder for human epidermal vekstfaktor-reseptor-2, forkortet HER-2. Dette er en reseptor som fremmer celletransformasjon og vekst. Det er sett overekspressjon av HER-2 både hos hund og menneske ved malign mammatumor, der det er en negativ prognostisk faktor. En liknende oppregulering er sett i osteosarkom-cellelinjer, men HER-2s rolle her er ikke fullstendig kjent (17).

Det er også sett at mTOR, en cellulær "hub" som integrerer signaler for vekst og cellesyklus, er aktiv hos osteosarkomceller. Overdreven aktivitet hos mTOR er knyttet til vekst, overlevelse og resistens mot kjemoterapi hos flere ulike kreftformer (17).

Tropomyosin-relatert kinase reseptorer (Trk) binder NGF-1, nok en vekstfaktor som fremmer mitose og hindrer apoptose i cellen. Her er det vist at osteosarkomer, både cellelinjer, primærtumores og lungemetastaser, i stor grad uttrykker Trk-A-reseptorer. Blokkering av denne signaleringen er også vist å inducere apoptose. Dette kan kanskje være et nytt behandlingsalternativ? (22).

Telomeraser har også vist seg å spille en viktig rolle for osteosarkomcellenes evne til å overleve og dele seg raskt. På enden av alle kromosomer har man telomere, som hindrer skadelige rekombinasjoner av cellens DNA. Telomeraser er enzymene som vedlikeholder telomere ved å stadig bygge på nye sekvenser på kromosomendene. Når telomeren aldri tar slutt har cellen i prinsippet ubegrenset mulighet til replikasjon. I en studie ble det funnet telomeraseaktivitet i 73 % av osteosarkomene som ble undersøkt, så sannsynligvis er denne egenskapen en viktig faktor i tumorpatogenesen (23).

Det er ikke bare molekylære veier til vekst og overlevelse som er viktige for at svulsten skal utvikle seg; det er vel så viktig at miljøet rundt kreftcellene er best mulig tilpasset tumorutviklingen. Her har osteosarkomcellene flere stoffer de skiller ut for å klargjøre veiet for lokal invasjon eller metastasering. For lokalinvasjon er

matrix-metalloproteaser (MMPs) viktig for å bryte ned vevet, mens for metastasering er proteinet ezrin nærmest essensielt (24).

## ***Patologi***

Osteosarkom er altså en malign mesenchymal tumor av primitive beinceller. Disse cellene produserer osteoid, hvilket er diagnostisk for svulsttypen og skiller den fra andre sarkomer i benvev. Det er mange typer histologiske subtyper av osteosarkom, karakterisert av cellene og typen matriks de danner. Man har osteoblastisk, chondroblastisk og fibroblastisk osteosarkom, samt en dårlig differensiert type og telangiektatisk osteosarkom (17).

Man har gjerne to makroskopiske hovedgrupper basert på svulstens utseende. Den første gruppen er svulster som bryter ned arkitekturen i benvevet, men ikke produserer større mengder kalsifisert matriks. Dette gir et osteolytisk bilde ved røntgenundersøkelse. Noen ganger kan disse svulstene være kraftig vaskulariserte, og kalles da telangiektatiske osteosarkomer. Disse kan være utseendemessig vanskelig å skille fra hemangiomer eller aneurysmale bencyster (17).

Den andre gruppen vil også ødelegge normal benvev, men produserer nytt neoplastisk benvev og har derfor et mer osteoblastisk bilde ved røntgen. Disse vokser raskt, og invaderer fort kortikalt benvev. Man får da en kraftig bløtvevsreaksjon med hevelse. Ofte vil de rasktvoksende svulstene produsere lite periostalt benvev, mens de saktevoksende ofte har større produksjon av periostalt og endostalt nytt ben (25).

De fleste osteosarkomer består imidlertid av en blanding av fibrøse, brusk- og benproduserende områder. Det makroskopiske og mikroskopiske utseendet vil styres av fordelingen mellom disse elementene, og det histologiske mønsteret kan derfor variere mye, selv innenfor en og samme tumor. En enkelt biopsi kan derfor gi feil diagnose – f.eks. chondrosarkom, fibrosarkom, hemangiosarkom eller reaktivt benvev. Derfor må histologiske diagnoser fra små biopsier tolkes med forsiktighet (17).



Lungemetastaser ved osteosarkom er som regel nodulære, hvilket er typisk for sarkomer. Ofte har de et rundt "kanonkule-aktig" utseende, men de kan også opptre som mange små svulster i et såkalt miliært mønster. Metastaser kan inneholde kalsifiseringer og osteoid (26). Ved osteosarkom og de fleste andre krefttyper vil det oppstå multiple metastaser i lungene. En enkelt nodul kan også forekomme, da særlig ved colon-, nyre-, bryst- eller testikkelkreft, samt noen melanomer og sarkomer (26).

Humane pasienter med metastasering til lunge har generelt lite symptomer fra lungene. Det forekommer hoste, evt. med blod, brystmerter og/eller dyspne (26).

Lungemetastaser er nodulære, og har ofte velavgransede marginer. De opptrer gjerne i subpleurale regioner og ved lungebasis. Størrelsen på metastaser i en lunge kan være forskjellig, avhengig av når de oppstod. Morfologien og immunhistokjemiske egenskaper hos metastaser likner egenskapene til primærtumoren. Man sammenlikner disse for å utelukke en samtidig primær lungetumor. Hos osteosarkom-metastaser kan man gjerne se osteoidproduksjon og kalsifisering - men også metastaser fra chondrosarkom, thyroideakarsinom, synovialsarkom, mammatumor og mucinøse adenokarsinomer kan kalsifiseres (26).

Lungemetastaser oppdages som regel med røntgen eller CT. Cytologisk undersøkelse av slim fra lungene, BAL eller lungebiopsi brukes for en sikker diagnose (26).

### ***Prognostiske faktorer***

Flere faktorer kan si oss noe om prognosen for pasienten. Det er vist at hunder yngre enn 5 år har en kortere overlevelsestid enn det eldre hunder har (17). En stor primærtumor vil også gi en dårligere prognose. Tumor lokalisering er også av betydning, og det er sett en sammenheng mellom tumorlokalisasjon og dårlig utfall (17). En høy tumorgrad og mitoseindex er også sett i sammenheng med en dårligere prognose. Osteosarkomer i hodet er ofte lokalt aggressive, men har en lavere metastaseringsgrad. Oppdagelse av metastaser gir naturlig nok en veldig dårlig prognose. Hunder hvor det ble oppdaget metastaser til bein hadde en lenge

overlevelsestid(i gjennomsnitt 132dager) enn der metastasene ble oppdaget i lunger (59dager), de som hadde metastaser både i lunger og andre organer hadde en enda kortere overlevelsestid (19dager) (17). Spredning til lymfeknuter ble sett å gi en kortere overlevelsestid, med en median på 58dager sammenliknet med 318dager hos dem uten en slik spredning (17).

En økning i serum alkaline phosphatase (ALP) har blitt assosiert med en dårligere prognose hos hunder med appendikulært osteosarkom i flere studier. Preoperativ økning i av total -ALP i serum eller en økning av ALPs bein isoenzymet er sett i sammenheng med en kortere sykdomsfri periode og overlevelsestid. Det er også sett at hunder som har forhøyede preoperative verdier og der disse verdiene ikke går tilbake til normalen innen 40 dager etter operativ fjerning av primærtumoren utvikler metastaser tidligere enn hos dem der disse verdiene synker (17).

Ezrin fungerer som et fysisk og funksjonelt anker for cytoskjelettets F-actin-fibre. Ezrin er viktig i cytoskjelettets remodellering og er nødvendig for osteosarkomets evne til å metastasere. Det har blitt vist at tilstedeværelse av høye ezrin konsentrasjoner i primære tumorer i median gav et kortere sykdomsfritt intervall, sammenliknet med dem med lave ezrin konsentrasjoner (17).

HGF-reseptor-genet også kalt MET er sammen med RON en del av en protooncogenfamilie. Signalering gjennom MET og RON fremmer tumorigenesen og dannelsen av metastaser. Det ble vist at uttrykkelse av RON uten MET gav en god prognose. Det ble også vist at en høy RON-uttrykkelse i primærtumoren gav en dårligere overlevelsestid enn der RON ikke var tilstede eller bare tilstede i lave nivåer (17).

VEGF er en viktig regulator for angiogenesen. Det ble sett at hunder med høye verdier av VEGF hadde et kortere sykdomsfritt-intervall enn det hunder med lavere nivåer. det ble derimot ikke sett noen signifikant forskjell i overlevelsestiden (17).

## ***Symptomer***

De vanligste kliniske tegnene på osteosarkom er halthet, smerte, tap av normal funksjon og en beinet hevelse i knokkel, men symptomene avhenger en del av tumorlokasjonen. Smertene forårsakes både av strekk i periost, trykk mot bløtvevet og mikrofrakturer i beinvevet. Nedsatt funksjon og halthet er ofte første symptom, og forekommer ofte før det oppstår en synlig hevelse hos hunden. Patologiske frakturer kan også forekomme, og gir da en akutt, ikke-vektbærende halthet assosiert med minimal fysisk aktivitet og ikke noe traume i tiden forut for bruddet (5).

## **Kreftutvikling og metastasering**

### ***Selvforsyning av vekstsignaler:***

For at normale celler skal gå fra hviletilstand til en aktiv proliferativ tilstand krever de mitogene vekstsignaler. Disse signalene blir overført via vekstfaktorer, og signalet blir formidlet inn i cellen via transmembrane reseptorer (27).

Normale celler er avhengig av vekst-signalering for å dele seg, hvilket sikrer normal, forsvarlig oppførsel hos de ulike cellene i et vev. De fleste løselige mitogene vekstfaktorer er produsert av en annen celletype enn den de skal fungere på. Mange kreftceller klarer selv å syntetisere de mitogene vekstfaktorer som de selv responderer på, såkalt autokrin stimulering. Dermed kan kreftcellen vokse og dele seg helt uavhengig av mitogene vekstfaktorer fra andre celler i miljøet. Evnen til selvproduksjon av vekstsignal styres av onkogener. Det er tre vanlige molekylære strategier for å oppnå selvstimulering; endring av ekstracellulære vekstsignaler, endring av transcellulær transduksjon av disse signalene, eller endring av intracellulære kretser som oversetter disse signalene til handling (27).

Overflatereseptorene på cellen, som sender det vekst-stimulerende signalet inn i cellen, er selve målet for deregulering i tumorpatogenesisen. I mange kreftformer er det vekstfaktor-reseptorer som ofte bærer tyrosinkinase-aktivitet i de cytoplasmatiske domener som er overuttrykt. Overekspresjon av reseptorer gjør det mulig for kreftcellen å bli hyperresponsive på nivåer av vekstfaktorer i omgivelsene som normalt ikke ville utløst proliferasjon (27).

Ved osteosarkom hos hund er det vist at det skjer en overekspresjon av de platederiverte vekstfaktor-reseptorene PDGFR $\alpha$  og PDGFR $\beta$ . Dette er to tyrosinkinasereseptorer og overekspresjonen av disse gir en autokrin eller parakrin signalvei som spiller en viktig rolle i utviklingen av osteosarkom. PDGFR $\alpha$  kan være egnede mål for behandling av hundens osteosarkom med en bestemt TKI, spesifikk target kinaseinhibitor (28).

## **p53**

p53 er et tumor suppressorgen, som hindrer at celler deler seg hvis genomet er skadet eller unormalt. Den unormale cellen vil så bli stoppet i cellesyklusen og DNA reparasjon aktiveres, hvis skaden er for stor vil apoptose induseres. På denne måten er p53 med på å hindre at unormale celler får dele seg (29).

Normal villtype p53 finnes i alle celletyper, men i små mengder. Halveringstiden er kort, noe som gjør den vanskelig å detektere med immunhistokjemiske metoder. Unormalt p53-protein kalles ofte tp53 og har en 10-20 ganger så lang halveringstid som villtypen. Dette gjør at proteinet kan akkumuleres i cellene og nå nivåer som er detektable med immunhistokjemi (29).

Dannelsen av unormalt tp53 kan skje ved mutasjon av p53 genet, eller ved at p53 bindes og danner komplekser med virale eller endogene proteiner. Deteksjon av tp53 indikerer derfor endringer i p53 genet eller p53-produktet, noe som igjen indikerer en endring mot en tumorassosiert fenotype. En økning i tp53 har blitt funnet i en rekke spontane tumorer. Tp53 ble vurdert for sin histopatologiske verdi under en studie gjort på 167 hunder med osteosarkom. Ble det funnet at frekvensen av og intensiteten av tp53 farging, kalt tp53 index, var høyere i osteosarkomer enn i andre typer sarkomer. Det ble også sett en sterk korrelasjon mellom tp53 index og klinopatologiske funn som histologisk utseende, grad av tumornekrose, mitosegrad, pleomorfisme, samt lokalisasjon. Chondroblastiske osteosarkomer ble funnet å ha en signifikant høyere tp53 index, mens telangiectatic osteosarkomer hadde en signifikant lavere index enn de andre histopatologiske subtypene av osteosarkom. Intakte hannhunder viste en høyere index enn kastrater, og rottweilere hadde generelt en høyere index enn både Grand danois og terriere (29). Dette støtter mistanken om at enkelte raser er mer predisponerte.

## ***Angiogenese***

Cellene er avhengig av oksygen og næringsstoffer for å opprettholde sin cellefunksjon og overlevelse. Dette vil si at alle celler i et vev må ligge innenfor 0,001mm fra en blodåre. Under organogenesen sikres denne nærheten ved en koordinert vekst av årer og parenkym. Når et vev er ferdig utviklet er angiogenesen nøye regulert av ulike signaler som stimulerer eller inhiberer prosessen (27).

Angiogenese initieres vanligvis av hypoksiske celler, som skiller ut flere angiogene faktorer. I dag kjenner man til mer enn 20 angiogent induserende faktorer og et tilsvarende antall inhibitor-proteiner. Eksempler på angiogenesehemmende substanser er thrombospondin-1, angiostatin, interleukin-12, kollagenfragmenter, fibronectin (SML angiogenese). De mest kjente angiogent fremmende faktorene er vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) og sure og basiske fibroblast vekstfaktorer (FGF1/2). Disse vil diffundere gjennom vevet og binde seg til transmembrane tyrosin kinase reseptorer på endotelceller (27). Endotelcellene vil da stimuleres til å bli såkalte migrerende tip-celler. Disse utskiller matrix-metalloproteaser som kan bryte ned basalmembranen. Tip-cellene har spesielle integriner uttrykt på overflaten som gjør at de kan migrere ut i vevet ved kjemotaksis og feste seg til ekstracellulær matriks (11, 30). Disse er forskjellige fra integrinene på endotelceller i ferdigdannede kapillærer (27). Tip-cellene orienterer seg mot høyere konsentrasjoner av angiogene faktorer. Etter tip-cellene følger flere stilkceller, som prolifererer og kan danne et begynnende lumen. Tip- og stilk-cellene modnes så til pericytter og endotelceller, og møter andre forløpere til kar slik at de kan lage et kapillærnettverk i vevet. Dette skjer både ved normal angiogenese og ved tumorangiogenese (11).

Proteaser kan også delta i reguleringen ved å styre biotilgjengeligheten av angiogenetiske aktivatorer og hemmere. Blant annet plasmin som er en proangiogenetisk komponent kan spaltes og bli til en angiogenese-inhibitor, angiostatin. Dette vil kunne være med på å regulere angiogenesen og vaskulær integritet (27).

På tidlige stadier i tumordannelsen skjer det genetiske og epigenetiske endringer som aktiverer onkogener og/eller inhiberer tumor-suppressorgener, slik at celledelingen øker og apoptosen nedreguleres. Dette gir en hyperplastisk vekst av tumorceller. Når de så når en viss størrelse vil imidlertid cellene lengst unna blodårene mangle tilstrekkelig oksygen- og næringstilførsel, cellene nekrotiserer og videre vekst av tumoren hemmes (27). Diffusjonsrekkevidden for oksygen og næringsstoffer er kort, og begrenser tumorstørrelsen til noen få millimeter (11). Imidlertid kan tumorceller overvinne dette problemet ved å aktivere angiogenesen (31). Dette gjør de ved å endre balansen mellom angione-induserende og angiogenese-hemmende faktorer. En vanlig strategi er å endre genuttrykket, ved å øke ekspresjon av VEGF og/eller FGF eller nedregulere ekspresjonen av en proto-angiogenese inhibitor som thrombospondin-1. I noen tumorer kan disse også være koblet. Et eksempel på dette er at thrombospondin-1 er positivt regulert av tp53 tumor suppressor protein i visse celletyper. Dette gjør at tap av tp53-funksjon, som er vanlig i de fleste humane tumorer, kan føre til at thrombospondin-1 nivået faller og mister sin hemmende effekt på angiogenesen (27). Kreftceller produserer ikke PKG som er et anti-VEGF-enzym. PKG vil normalt vil hemme beta-catenin, som normalt stimulerer angiogenesen. Dermed hemmes ikke angiogenesen som normalt og tumoren kan ekspandere (32).

Den fenotypiske endringen fra en tumor i hvilefase *in-situ* til en vaskularisert tumor med eksponensiell vekst kalles "the angiogen switch". I prevaskulær fase kan celledelingen være like rask som i vaskulærfase, men apoptoseratioen vil være tilsvarende slik at tumorstørrelsen er stabil. Når tumorcellene har sikret seg en kilde til oksygen, næringsstoffer og avfallshåndtering, kan de ekspandere videre. Det er også sikret en portal for hematogen spredning og metastasering (33).

Blodtilførselen til tumoren kan også videreutvikles ved at progenitorceller fra benmargen utvikles til endoteliale forløperceller og bidrar til neovaskularisering. Disse cellene utvikles fra hematopoetiske cellelinjer ved høye nivåer av VEGF, og rekrutteres så fra blodet for å danne nye kar rundt tumoren (33).

## ***Celler over i blodet***

De fleste ondartede neoplasier vil et sted i utviklingen frigi celler som kan invadere nærliggende vev, eller som vandrer til fjerne steder og hvor de kan danne nye kolonier. Det er disse «nye» tumorene, metastasene, er noe av årsaken til at 90% av hunder med osteosarkom dør eller avlives (3). De nydannede metastasene oppstår som en kombinasjon av kreftceller og normale støttceller fra vertsvetet. Invasjon og metastasering er komplekse prosesser, som ennå ikke er fullstendig forstått. Begge disse måtene å spres på benytter de samme strategiene, som involverer endring av fysiske koblinger av celler til deres mikromiljø og aktivering av ekstracellulære proteaser (27).

Celler med invasive eller metastatiske evner har en endret tilheftning til sine omgivelser. Celler binder til hverandre og ECM med overflateproteiner kalt CAMs (34). En type av CAMs er cadherin. Cadherinene har fått navnet etter hvilket vev de ble funnet i; E-cadherin uttrykkes på overflaten av alle epitelceller. Her danner den en viktig bindingen mellom cellene ved at den binder cytoskjelettet til ulike celler sammen. E-cadherin er avhengig av  $Ca^{2+}$  for å kunne danne en stabil tilknytning her. Selve bindingen skjer via cateniner, som er intracellulære anker-proteiner. Catenin binder cadherin til cytoskjelettet (34).

En vanlig endring i interaksjoner mellom celle og miljøet ved kreft er nettopp endring i uttrykkelsen av E-cadherin. Normalt overføres anti-vekst og andre signaler ved cytoplasmatiske kontakt med  $\beta$ -catenin til intracellulære signalkretser i neste celle. Denne E-cadherin-bindingen er funksjonelt tapt i flere epiteliale kreftformer. Dette tapet skjer ved ulike mekanismer; mutasjonsinaktivering av E-cadherin- eller  $\beta$ -catenin-gener, ved at transkripsjonen av disse undertrykkes eller ved proteolyse av det ekstracellulære cadherin-domenet. Uten funksjonelt E-cadherin får cellene mulighet til å løsne og dermed invadere og metastasere (27).

På sin vandring møter kreftcellene ulike omgivelser som kan presentere nye matrikskomponenter. Kolonisering av disse nye områdene krever tilpasning. Denne tilpasningen oppnås gjennom endringer i spekteret til integrin  $\alpha$  eller p-subenheter som uttrykkes av de migrerende cellene. Ulike integrinundertyper oppnås ved



permutasjoner, og gir forskjellige substratpreferanser. Karsinom celler kan lette invasjonene ved å forskyve ekspresjonen av integriner fra de som favoriserer ekstracellulær matrix som er tilstede i normalt epitel, til andre integriner som binder til nedbrutte stromale komponenter produsert av ekstracellulære proteaser. Det er et stort antall forskjellige integrin-gener, med et enda større antall av heterodimere reseptorer som følge av ulike kombinasjoner av  $\alpha$  og  $\beta$  reseptorsubenheter. Disse reseptorene spiller mest sannsynlig sentrale roller i evnen til invasjon og metastasering (27).

En annen mekanisme for invasiv og metastatisk evne involverer ekstracellulære proteaser. Matrix-nedbrytende proteaser dannes nært celleoverflaten i kreftcellene, og har en transmembran komponent som kan feste seg til proteasereseptorer eller integriner på andre celler. Man tror at dette bindingen gjør det lettere for kreftcellene å migrere gjennom kapillærvegger og inn i vevet (27).

Sentralt i utviklingen av invasiv og metastatisk evne står altså aktivering av ekstracellulære proteaser og endrede bindingsspesifisiteter hos cadheriner, CAM, og integriner. Disse skiftene reguleres av kretser og molekylære mekanismer som ser ut til å variere mellom ulike miljøer (27).

### ***Metastaseringsprosessen***

Metastasering er definert som en disseminering av neoplastiske celler til et nytt sted i kroppen, der de etterhvert danner en makroskopisk masse. Metastasering er en trinnvis prosess der cellen først må forlate primærtumor, komme seg gjennom basalmembranen og ut i sirkulasjonen, og så overleve i dette nye miljøet og til slutt klare å forlate sirkulasjonen og trenge inn i målvevet for metastasering. Kreftcellen må ha evne til genendringene som kreves for å overleve hele denne turen for å suksessfullt etablere seg i et nytt vev (17).

### ***Epitelialt-mesenchymalt skift***

Under kreftutviklingen utvikler osteosarkomceller evne til å metastasere.

Overgangen fra epitelial til mesenchymal celletype, også kalt EMT har fått betydelig oppmerksomhet i denne sammenheng. Den mesenchymale overgangen skjer ved at osteosarkomcellene oppregulerer mesenchymale markører og hemmer de epiteliale markørene (35).

EMT karakteriseres ved tap av den nevnte epiteliale markøren E-cadherin, sammen med økt ekspresjon av mesenchymale markører, som N-cadherin og vimentin. Under utviklingen av metastatiske egenskaper vil EMT gjøre at primære epitelceller utvikler mesenchymale fenotyper, med økt bevegelighet og invasivitet. Dette trigger løsningen av celler fra svulsten og invasjon inn i nærliggende blodkar (35)

Genet TSSC3 har en tumorsuppressorevne og det er vist at undertrykking er forbundet med malignitet og progresjon ved osteosarkom. Dette genet er det første apoptose-relaterte genet som er maternalt imprintet, altså bare uttrykkes fra mors genmateriale. TSSC3 har en tumor suppressor-liknende rolle ved at den hemmer vekst og induserer apoptose. Om TSSC3 nedreguleres vil fraværet av dets hemmende effekt utløse flere signalkaskader som gir økte mengder beta-catenin og transkripsjonsfaktoren Snail inne i cellen via den såkalte Wnt-signalveien. beta-catenin og Snail går inn i cellekjernen hvor de gir økt uttrykkelse av gener som induserer cellemigrasjon, øker den invasive evnen og fremmer EMT (35).

Forstyrrelser og unormale mengder B-catenin er sett ved humant osteosarkom, og det undersøkes derfor om å hemme Wnt/B-catenin-signalveien kan være en mulig behandlingsstrategi (35).

TSSC3 er nedregulert i humane osteosarkom-cellelinjer og vev, og flere andre humane krefttyper. En studie på osteosarkomceller viste at de mest migrerende underlinjene av celler også uttrykte de høyeste nivåene av mesenchymale markører (N-cadherin, vimentin, og Snail), og viste det laveste nivået av epitel markør E-cadherin. Videre fant de at de mest migrerende cellelinjene viste en løsere cellekontakt og en spindelformet morfologi som er representative for EMT, ulikt

deres opprinnelige utseende. Dette indikerer at TSSC3 spiller en sentral rolle i EMT i osteosarkomceller og for migrasjonsevnen (35).

### ***Anoikis***

Når cellene har gått gjennom epitelialt-mesenchymalt skift og brutt ut fra primærtumoren, kommer de ut i vaskulaturen. Her flyter de avgårde med blodet, og har ikke lenger feste til en ekstracellulær matrix. I normale celler vil mangelen på et slikt feste indusere en spesiell apoptosemekanisme kalt *anoikis* (gr. hjemløshet). Denne formen for celledød skal hindre ektopisk cellevekst i kroppen, og tumorcellene må altså være i stand til å overvinne denne mekanismen for å kunne slå seg ned og metastasere i andre deler av kroppen. Flere onkogener, f.eks PI3K og FAK, og tap av tumor suppressor-gener har vist seg å gjøre celler resistente mot anoikis og gi dem metastatisk kapasitet. Det er forsket noe på anoikis ved osteosarkom, og funnet at noen celler har endret mønsteret på integrinekspressjonen, og beskyttes da mot anoikis via P13K/Akt-signalveien (36).

### ***Mikrometastaser***

Mikrometastaser defineres som klinisk upåvisbare kreftceller som har forlatt primærtumoren. Man inndeler gjerne disse i sirkulerende tumorceller (CTCs) i blodet, og dissiminerte tumorceller (DTCs) distribuert ut i vevet med blodet (36). Dette er de første frøene for metastatisk sykdom, og flere studier har vist at påvisning av slike mikrometastaser ved en fast primærtumor er assosiert med dårligere prognose (37). Mikrometastaser er ofte ikke så hurtigdelende (og dermed Ki-67 negative) og i enkelte tilfeller lite mottakelig for kjemoterapi. Men ikke alle pasienter med mikrometastaser vil utvikle metastaser, og mekanismene bak dette er ennå ikke forstått. Det er lagt frem en teori om at cellene ligger i et hvilestadium, som ved noen kreftformer kan være langvarig. Dette forklarer blant annet langvarige sykdomsfrie intervaller ved noen typer kreft (36).

Overlevelsen ved humant osteosarkom er forbedret etter introduksjonen av nye typer kjemoterapi, og 5-års overlevelse er nå oppe i 60-70 %. De som nå dør av

sykdommen dør av metastasene, til tross for god behandling. Man tror dette skyldes at mikrometastaser ikke lar seg utrydde av kjemoterapien, og derfor kommer igjen. En norsk studie fra 2005 viste at 54 % av osteosarkom-pasienter uten påviste metastaser hadde tumorceller sirkulerende i blodet og i beinmargen. Påviste CTCs og DTCs viste seg å korrelere med tilbakefall og dårligere prognose (4).

### ***Seed and soil***

Stephen Paget stilte i 1889 spørsmålet mange etter ham også har lurt på: "What is it that decides what organs shall suffer in a case of disseminated cancer?" (38).

Paget skrev i sin artikkel at hvis alle organene i kroppen er passive, og like klare til å motta partikler som blir brakt til dem, ville fordelingen av kreft til kroppen vært helt tilfeldig. Hvis man kan finne en form for regel eller sekvens i fordelingen, en hvilken som helst forbindelse mellom egenskapene til det primære vekst og situasjonen for de sekundære metastasene, kan ikke de eksterne organene være helt passive når det gjelder metastaser, som han kalte emboli. Han tenkte at emboli kunne ha innflytelse på det vevet de metastaserer til, som gjorde at de kunne vokse og danne nye svulster. Han sier også i sin artikkel at hver enkelt kreftcelle må anses som en organisme, i live og i stand til utvikling, og sammenlikner dette med når en plante danner frø og disse blir spredt i alle retninger. Men frøene kan bare leve og vokse hvis de faller i god og næringsrik jord, og derfor har denne teorien fått kallenavnet "seed and soil-teorien". Også andre i hans samtid frontet denne teorien, blant annet Fuchs som mente at visse organer kunne være predisponert for sekundær kreft (Paget, Stephen, 1889, the distribution).

I dag er denne teorien fortsatt svært aktuell, og man forsker stadig på å finne ut hvorfor enkelte krefttyper først og fremst metastasere til bestemte organer. Med tanke på osteosarkomer er spørsmålet fortsatt hvorfor kreftformen metastasere til først og fremst lunger, og når i sykdomsforløpet denne celledistribusjonen skjer (38).

### ***Metastasing og etablering i nytt vev***

Etter at en kreftcelle har løsnet fra primærtumoren entrer den blod- eller lymfe - sirkulasjonen. Kreftcellene i sirkulasjonen vil kunne kile seg fast i kapillærer, og kanskje klare å forlate karet og trenge inn i et nytt vev (39). Dette vevet vil være ganske forskjellig fra vevet tumorcellen utgikk fra, og å overleve her er utfordrende. Ezrin, et protein som knytter cytoskjelettet til cellemembranen, er viktig for osteosarkomcellenes evne til å kommunisere med mikromiljøet rundt cellen. Cellen kan ved hjelp av ezrin sende ut signaler gjennom vekstfaktor-reseptorer og adhesjonsmolekyler (24). Signaleren er vist å hjelpe cellen å tilpasse seg stress i det nye vevet, der det er ulik oksygentensjon, pH og næringstilgang enn i primærvevet, og kanskje også en inflammasjon. Ezrin endrer også genekspressjonen i cellen og gir den en mer effektiv oksydativ fosforylering og glykolyse. Det er vist en direkte sammenheng mellom ezrin-ekspressjon og metastasingsevne, og man regner ezrin som et viktig mål for potensielle nye behandlingsmetoder for osteosarkom (24). Dersom den maligne cellen overlever den første tiden i det nye miljøet kan den forbli i et sovende stadium, eller begynne å proliferere. Cellene prolifererer i det nye vevet og etterhvert som de danner en større tumor vil avstanden til karet bli lengre og tilgangen på næringsstoffer minker. For å motvirke dette må angiogenesen fremmes (39).

## **Påvisningsmetoder**

### ***Påvisning av celler i blod***

Sirkulerende tumorceller (CTCs) har lenge vært sett på som en refleksjon av tumorens aggressivitet. Hematogen spredning av tumorceller er et viktig steg i metastaseringskaskaden. En ny teknikk har gjort det mulig å identifisere slike sirkulerende tumorceller. Dette kan være et nyttig verktøy for å si mer om prognose hos pasienter (40).

For å isolere CTCs bruker man en ISET assay metode med 5µm gaps mellomrom. Denne størrelsen gjør at blodcellene faller gjennom, mens større og mindre fleksible celler blir igjen. Cellene holdes intakte noe som gjør at immunocytokjemi- og immunofluorenssteknikker kan benyttes på de individuelle CTCsene. Denne metoden har blant annet blitt brukt med tanke på brystkreft og colonkreft (40).

Videre bruker man metoder som går ut på å finne spesifikke markører som uttrykkes på CTCsene. Blant annet epiteliale markører og cytokeratiner, som uttrykkes hos nesten alle tumorceller med epitelopphav. En annen strategi er å benytte tumorspesifikke markører, som bare uttrykkes av tumorceller. De epitelspesifikke antigenene vil kunne markere ikke-tumor-epitelceller, noe som kan gi falske positive. CTCs som ikke uttrykker den bestemte markøren vil kunne oppfattes som falsk negativ. Markørene kan være magnetiske, slik at cellene med markørene får en annen ladning og dermed kan plukkes ut hele. Under metastaseringen kan cellene undergå en EMT skift, som gjør at CTCsene kan miste sine epiteliale egenskaper, samt sine overflate markører og cytokeratiner. Denne endringen fra epitelial til mesenkymal ble sett i sammenheng med aggressiviteten til tumorceller in vivo, willipinski-stapelfeld et al. Dette gjør at assays som er laget for å detektere CTCs i blod kan miste de mest invasive tumorcellene (40).

## ***Radiologisk undersøkelse***

Den første man som kliniker gjør ved mistanke om osteosarkom, er gjerne å ta røntgenbilder. Her er bilder av god kvalitet i flere plan viktig. Benforandringene man eventuelt vil se på røntgen befinner seg et sted i spekteret mellom strek osteolyse og kraftige osteoblastiske eller osteogene forandringer, og det kan være partier med svært ulik histologi selv innad i en svulst. Det finnes imidlertid noen typiske trekk ved osteosarkomer. Lysis av korteks er vanlig, noen ganger med patologisk fraktur, og gjerne med en bløtvevsreaksjon i området rundt. Nytt ben dannes da i et mønster fra aksen i korteks, og kan likne solstråler eller striper. Når tumoren invaderer korteks vil også periost heves, og nytt benvev dannes i det osteogene laget som respons. Dette gir en klassisk fortykkelse av korteks rundt lesjonen som kalles Codman's triangel. Dette er imidlertid ikke et patognomonisk røntgenfunn ved osteosarkom. Osteosarkomer vil sjelden invadere leddbrusk og krysse ledd. Imidlertid vil svulsten ofte invadere omkringliggende bløtvev, og kan derfra i noen tilfeller også invadere nye knokler (17).

Andre røntgenfunn ved osteosarkomer er tap av trabekelstrukturen i metafysen og en glidende overgang til normalt benvev, heller enn en skarp kant. På røntgenbilder kan osteosarkomer likne mye på osteomyelitt. Andre differensialdiagnoser kan være primære bensvulster, metastasering til benvev, lymfom i benvevet eller bencyster. Basert på signalement (spesielt rase og størrelse), anamnese, klinisk undersøkelse og røntgenfunn har man ofte en sterk mistanke om osteosarkom og en presumptiv diagnose (17).

## ***Biopsi***

Sikker diagnostisering av et osteosarkom krever biopsi og histopatologisk undersøkelse. Cytologi er ikke tilstrekkelig. Når det skal hentes ut en biopsi bør man vurdere fordelene og ulempene ved typen instrument man bruker. En stor biopsi vil kanskje gi et bedre histopatologisk bilde av svulsten, men øker også risikoen for patologisk fraktur. En Jamshidi-biopsinål for beinmarg brukes ofte. Biopsistedet må velges med omhu. Man ønsker å hente prøven fra sentrum av lesjonen, og stikke slik at prøvekanalen senere kan fjernes i sin helhet i forbindelse med evt. kirurgisk

behandling. Nerver, kar og ledd skal selvsagt unngås. Biopsien utføres med hunden i anestesi og kirurgiske krav til sterilitet. Det gjøres først et snitt i huden, så fører man nålen gjennom i tumoren og inn til benmargshulen. Nålen fjernes, og prøven hentes ut. Man kan hente ut 2-3 prøver fra samme hudsnitt ved å vinkle nålen en annen vei og stikke igjen. Man ønsker vevsprøver på 1-2 cm. Disse fikses på 10 % formalin, og bør sendes til en patolog med erfaring innen diagnostikk av sarkomer. Grunnet tumorvevets heterogenitet er det ikke alltid man får korrekt diagnose. Om tumoren siden fjernes, enten ved full amputasjon eller ekstremitetsbevarende kirurgi, bør hele eller større deler av svulsten sendes inn for å bekrefte diagnosen (17).

### ***Patologisk gradering***

En patologisk gradering er å vurdere stadiet av sykdommen ved diagnosetidspunktet. Det er viktig å undersøke pasienten nøye med tanke på eventuell spredning. Man bør palpere regionale lymfeknuter grundig, selv om de sjelden er involvert. Om man har spredning til lymfeknuter er prognosen dårligere. Lungemetastaser er den absolutt største bekymringen ved mistanke om eller diagnostisert osteosarkom. Man påviser disse metastasene med røntgenbilder, som tradisjonelt tas i tre plan; lateralt høyre og venstre side og ventrodorsalt. Lungemetastasene har normalt bløtvevstetthet, og ses ikke på røntgen før de er 6-8 mm i diameter. Tradisjonelt har man funnet lungemetastaser ved diagnosetidspunktet hos under 10 % av hundene som undersøkes med røntgen (17).

En studie utført på 39 hunder med bekreftet osteosarkom fant imidlertid lungemetastaser hos 11 av tilfellene på CT, og bare hos to med ordinært røntgen. Studien konkluderte med at CT er bedre og mer sensitivt enn røntgen ved screening for lungemetastaser ved osteosarkom (41). Dette bekreftes også i andre studier (42). Når avansert bildediagnostikk blir vanligere og mer tilgjengelig blir dette antakelig et viktig verktøy for å si noe om prognose og gradering av osteosarkom og andre kreftsykdommer hos hunder.



Man bruker et kirurgisk graderingssystem for humane sarkomer også hos hund. Dette beskriver histologisk gradering (G), anatomien rundt primærtumor (T) og regional eller fjern metastasering (M).

Stadium I – G1, lavgradig lesjon uten metastase

Stadium II – G2, høygradig lesjon uten metastase

Stadium III – Lesjon med lokal eller fjern metastasering, uavhengig av gradering.

Stadiene kan deles inn i intracompartmental (a) og ekstracompartmental (b)

anatomisk setting, avhengig av om svulsten har vokst gjennom periost eller ei. Med dette systemet vil de fleste hunder med osteosarkom på diagnosetidspunktet være i stadium II-b.

Pasientens generelle helsestatus må også tas i betraktning når man vurderer behandling. Alder står ikke i veien for å behandle hunden, men pasienten skal ofte gjennom en lang anestesi og kjemoterapi, og kardiovaskulær funksjon og nyrefunksjon bør derfor være normal. En minimum database for en osteosarkom-pasient som skal behandles er derfor hematologi, biokjemi og urinanalyse. Måling av serum-AP-nivå kan si noe om prognosen.

TNM klassifisering av maligne tumorer.

Fra WHO, adaptert for OS hos hund

- T: Primærtumor
- T1: Tumor begrenset innen medulla og cortex
- T2: Tumoren strekker seg utenfor periost
- M: Metastasering
- M0: Ingen tegn til fjernmetastase
- M1: Fjernmetastase oppdaget

(5)

## **Behandling av osteosarkom hos hund**

### ***Kirurgi***

Amputasjon er regnet som standardbehandlingen ved osteosarkom hos hund. Kirurgi alene regnes imidlertid bare som palliativ behandling, da mikrometastaser antas å være tilstede hos flertallet av OSA-pasientene ved diagnosetidspunkt (17). 72 % av hundene som behandles med kun amputasjon dør eller avlives grunnet problemer knyttet til metastasering, med en gjennomsnittlig overlevelse på bare 19 uker (43). Anbefalt behandling er derfor amputasjon i kombinasjon med kjemoterapi; ved kirurgi + kjemoterapi er sykdomsfritt intervall betydelig lenger. Langtidsprognosen for hunder med OSA er likevel dårlig, med bare 10-15 % overlevelse etter 2 år (3).

Om man skal amputere ved osteosarkom i forbenet anbefales stort sett en full amputasjon av hele benet, inkludert skapula. For bakben er det vanligst med en coxofemoral disartikulasjon, eventuelt acetabulektomi (17). Pasienten må vurderes grundig preoperativt, særlig med tanke på andre ortopediske eller nevrologiske problemer eller kraftig overvekt.

En nederlandsk studie har undersøkt eierens oppfattelse av hundens funksjon etter amputasjon, der 16 der 44 hunder var amputert grunnet osteosarkom. Man fant at 41 av 44 hunder tilpasset seg "svært bra" til å gå på 3 ben. Halvparten av eierne hadde hatt motforestillinger mot amputasjon på forhånd, men det var ingen som oppga å angre på avgjørelsen i ettertid, inkludert to eiere som måtte avlive sine hunder. Flertallet av hundene hadde oppnådd tilfredsstillende funksjon innen en måned etter operasjonen, og 33 av eierne fortalte at hundenes rekonvalesens var raskere enn de selv hadde forventet. Det ble heller ikke funnet tegn til lengre rekonvalesenstid eller dårligere funksjon hos de hundene som var av større raser eller hos eldre hunder (5).

De fleste hunder klarer med andre ord å kompensere for et manglende lem, og flertallet av eierne var fornøyde men hundens funksjon og livskvalitet i ettertid. Amputasjon grunnet osteosarkom utføres antakelig relativt sjeldent i Norge. Rådet for Dyreetikk uttalte i 2000 at de ikke så det tilrådelig med amputasjon ved

osteosarkom, med eller uten adjuvant kreftbehandling, og står ved sin uttalelse i dag. Begrunnelsen er at sykdomsfritt intervall er relativt kort, og at hunden i behandlingsperioden vil utsettes for store belastninger, for så å mest sannsynlig måtte avlives grunnet metastatisk sykdom etter kort tid. Rådet mener imidlertid at amputasjon kan være akseptabelt i tilfeller der dyret oppnår en god funksjon postoperativt og kan ha tilnærmet normal fysisk utfoldelse (44).

Et annet kirurgisk alternativ er en såkalt *limb-sparing surgery*, der man fjerner primærtumoren, inklusive marginer, men forsøker å bevare benets bære- og funksjonsevne. Denne teknikken foretrekkes innen humanmedisin, og er de siste årene også i økende grad brukt hos hund. På Colorado State University Animal Cancer Center er det jobbet med dette i 20 år, med gode resultater hva gjelder funksjon og omtrent samme overlevelse som konvensjonell amputasjon (45).

For å gjøre limb sparing surgery kreves det at svulsten affiserer mindre enn 50 % av knokkelen, og at bløtvevsreaksjonen er lokalisert og definerbar. Ofte får pasientene kjemoterapi i forkant av operasjonen. Hunder med tumor i distale radius eller ulna har best prognose for denne typen kirurgi, da karpal artrodese ofte har gode resultater. Artrodese av skulderledd, hoftledd, kne og hase ved limb sparing surgery gir dårligere funksjon. Denne typen kirurgi er avansert, og krever et team av erfarne kirurger, onkologer, radiologer og annet personell. Det finnes flere forskjellige metoder med allografts, autografts og proteser (17).

### ***Kjemoterapi***

Adjuvant behandling med kjemoterapi nødvendig i tillegg til kirurgi for best mulig prognose hos hunder med osteosarkom. Mange ulike kjemoterapeutika er forsøkt på hund, alene eller i kombinasjon. Dette har ofte vært i humant forskningsøyemed, og er dermed godt dokumentert (17).

*Cisplatin* er brukt hos barn med osteosarkom, og har også vist seg å forlenge overlevelsestid etter amputasjon hos hund (46), med 43 % overlevelse etter 1 år 16 %

overlevelse etter 2 år. *Karboplatin* er mindre nefrotoksisk og mye brukt da det er lett å administrere og tolereres godt, men gir noe kortere overlevelse enn *cisplatin* (47).

*Doxorubicin* regnes også som effektivt for å hemme utvikling av mikrometastaser hos hunder med OSA. En studie med 2-3 doser *doxorubicin* før amputasjon samt 5 behandlinger med 14 dagers intervaller i etterkant ga overlevelse på 50,5 % ved 1 år og 9,7 % ved to år (48).

Det er vanlig å bruke behandlingsprotokoller med mer enn ett kjemoterapeutikum fordi man ønsker en bedre kombinert effekt. Vanlige kombinasjoner er *doxorubicin-cisplatin* og *doxorubicin-karboplatin*, men ingen av disse har betydelig lengre sykdomsfritt intervall eller overlevelse enn andre behandlinger (17).

Metastasene er fortsatt en stor utfordring ved behandling, også humant. Frem til man effektivt kan hemme eller hindre disse i å oppstå står overlevelsestidene for både hund og menneske mer eller mindre stille. Man antar at man i fremtiden vil behandle kreftpasienter mer individtilpasset, kanskje med medikamenter rettet mot spesifikke molekyler og immunmodulerende medisiner i kombinasjon med tradisjonell cellegift. En prospektiv studie på 62 barn med osteosarkom har vist lovende resultater ved intense doser *cisplatin* og *doxorubicin*. Behandling ble gitt hver 3. uke inntil man observerte > 90 % reduksjon i neovaskularisering av tumoren ved angiografi. Først da fjernet man tumoren med limb preserving-metode. Estimert overlevelse ved 10 år var hele 93 %, der 86 % heller ikke hadde hatt tilbakefall (49). En tidligere studie med tilsvarende behandlingsprogram er også gjort i Italia med liknende resultater (50).

## **Hunden som modellorganisme**

Naturlig forekommende kreft hos hunder brukes som en modell for tilsvarende sykdom humant, fordi artene ofte har store likheter histologisk, tumorbiologisk og i hvordan sykdommen skrider frem og metastaserer. Etter man sekvenserte hundens genom i 2005 er de spontane neoplasiene hos hund brukt mye i preklinisk kreftforskning humant (51).

### ***Humant osteosarkom***

Osteosarkom forekommer også hos menneske, og er også her en aggressiv malign tumor der mortaliteten er høy. Hos menneske rammes først og fremst unge; 75 % av tilfellene oppdages hos pasienter mellom 10 og 25 år. OSA forekommer hyppigst i metafysene til lange rørknokler, spesielt femur (45 %), tibia (15 %) og humerus (10 %) (52).

Ved humant osteosarkom er overlevelsen etter 5 år 75 % ved lokalisert sykdom behandlet med kirurgi og kjemoterapi. For pasienter der man har oppdagat metastaser er 5 år overlevelse bare 15-20 % (52). Over 30 % av pasientene med metastatisk OSA responderer dårlig på kjemoterapi (53).

Hunden er i en særstilling som modellorganisme for forskning i humanmedisinsk øyemed, da sykdommen hos artene likner hverandre histologisk, metastatisk og prognostisk. Grunnet den høyere forekomsten har man også en større populasjon pasienter å samle data fra. Hunden er også en viktig modell fordi tumoren oppstår spontant. Hunden er mer genetisk lik mennesket enn mange andre vanligere laboratoriedyr, og lever tett på oss i samme miljø (52). Det er forsøkt å bruke mus og rotter som modeller, men man har ikke klart å gjenskape de komplekse biologiske egenskapene som definerer OSA hos menneske og hund, som for eksempel predileksjonssted i rørknokler og metastaseringen til lunger (3). Fra et dyrevelferdsmessig ståsted er også hunden en god modellorganisme. Ingen dyr må

gjøres syke, og resultater i forskningen kan også benyttes til behandling og palliativ terapi innen veterinærmedisinen.

Det er de senere årene også funnet mange likheter i de genetiske egenskapene til osteosarkomceller hos hund og menneske. Begge arter har 75 % aneuploid DNA-indeks og komplekse og kaotiske karyotyper. 90-95 % er histologisk høygradige hos begge arter. Flere av genene man mistenker er involvert i OSA hos barn er også funnet hos hunder:(53).

- PTEN phosphate- and tensine homolog
- RB1 retinoblastoma 1
- EZR ezrin
- MET proto-oncogene/ HGF hepatocyte growth factor
- ERBB2 v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
- TP53 tumor protein 53

Se Vedlegg : osteosarkom hos hund og menneske.

### ***P53s rolle hos hund og menneske***

Det er funnet mutasjoner i p53-genet i osteosarkomceller hos både hund og menneske (tp-53). Proteinet p53 er en regulator i cellereplikasjonen, og ved mutasjoner kan cellen få ubegrenset evne til deling. Det er sterk homologi i strukturen til p53-proteinet hos de to artene. Hos menneske er det funnet mutasjoner i 15-30 % av osteosarkomtilfellene, og omtrent samme frekvens gjentar seg hos hund. Imidlertid er det ulike typer av mutasjoner som ligger til grunn for dysfunksjonen. Hundens tp53 likner mer på menneskets enn tp53 hos mus og andre forsøksdyr. Ved forskning på hund har man sett samme deregulering av signaleringsveiene som hos menneske; der blant annet kjemokiner, cytokiner, apoptosesignaler, interleukiner og Ras rammes. Det ble også sett koekspresjon av HGF hepatocyte growth factor og proto-oncogenet c-Met i alle OSA-tumorene i denne studien (51). Disse er vist å være involvert i vekst, invasjon og metastasering i humant osteosarkom.

Hunden har også vært modell for kirurgiske teknikker ved OSA-behandling, spesielt “limb-saving surgery” med metallimplantater eller allografts (54). Imidlertid er det et problem at hundene med OSA er fullvoksne og har lukkede fyser, og derfor ikke kan brukes som modeller for videre vekst og lengdeproblemer etter operasjon (55).

### ***Genekspresjon i OSA hos hund - noen gener er knyttet til kort eller lang overlevelse***

En undersøkelse der man lette etter prognostiske biomarkører for osteosarkom hos hunder. Man fordelte OSA-pasienter i to grupper etter overlevelsestid; kort overlevelse (< 6 mnd) og langtidsoverlevelse (> 6 mnd). Man fant 51 ulike ekspresjoner mellom gruppene, oftest oppregulering hos de korttidsoverlevende. De oppregulerte genene hadde mulige roller innen proliferasjon, resistens mot medikamenter eller metastasering. Man fant flere deregulerte pathways, blant annet Wnt-signalering, integriner, kjemokiner og cytokiner. Den samme dereguleringen er sett i tilsvarende pathways hos mennesker med OSA (51).

Slike resultater kaster ikke bare lys over den molekylære prosessen bak OSA, men kan etterhvert kanskje brukes diagnostisk og prognostisk. Forhåpentligvis kan man også rette behandling mot spesifikke gener og pathways i fremtiden. Hunden vil her være en viktig og verdifull preklinisk modell.

## Fargemetoder

### ***TP-3***

TP-3 er et IgG2 monoklonalt antistoff som gjenkjenner osteosarkomceller hos menneske og hund. Antistoffet fester seg på et antigen på cellemembranen hos osteosarkomcellene (56). TP3 binder ikke til osteocytter eller hvilende osteoblaster, men binder derimot til prolifererende osteoblaster i callusvev, vekstplater i epifyser og til regenererende spongiøst beinvev. Normal brusk og fibrøst bindevev vil derimot ikke binde. I studien fant de også at endotelceller i angiogenese tilstede både i sarcomer og ikke-sarkom-tumorer bandt antistoffet, mens endotelceller i normale vev ikke bandt (57).

ALP-aktivitet korrelerte ikke med antigenekspresjonen og den høyeste enzymaktiviteten ble funnet hos en antigen negativ osteosarkom celle-linje. Dette viser at TP-3 ikke binder til ALP slik andre TP har gjort. Molekylærvekten til antigenet som TP-3 binder til har blitt estimert til å være 80,000. Det virker som at dette antigenet har en veldig restriktiv biodistribusjon. Antigenet har vist seg å være ganske motstandsdyktig mot proteolytiske enzymer. Siden behandling med neuraminidase og periodatbehandling ikke påvirket bindingen til antigenet indikerer dette at epitopen sannsynligvis ikke består av sukkerdeler, ettersom disse da ville blitt spaltet og mistet sin evne til å binde antistoffet (57).

TP-3 bandt til alle de 31 osteogene sarkomene som ble testet. Det at det binder til 100% av osteosarkomene og ikke kryssreagerer med tumorceller av ikke sarkomer, gjør at det kan benyttes som en spesifikk tumor type binder (57). Ved å benytte immunhistokjemisk farging kan man se hvilke celler i et vevssnitt som har TP-3 antistoff festet til seg. Denne metoden vil vi bruke for å se etter metastaser på cellenivå i lungevevet hos hund.



## **Materiale og metoder**

### ***Materiale***

Materialet besto av tre hunder (en hund som ikke hadde kreft, og to hunder med diagnostisert osteosarkom ved klinikk, biopsi og røntgenfunn) som ble obdusert, og hvor det ble tatt ut helt ferske lungebiopsier fra alle lungelapper. Det forelå skriftlig godkjenning fra eieren om at obduksjon kunne gjennomføres.

Undersøkelsen var designet som et åpent, ikke randomisert, postmortalt studium der inklusjonskriteriene var: 1) eier var villig til å la hunden obdusere umiddelbart etter avliving 2) hunden måtte kunne obduseres i løpet av 30 min. – 2 timer etter avliving for å minimalisere postmortelle forandringer, 3) hunden skulle være en større hunderase  $\geq 14$  kg, 4) begge kjønn inkludert kasterte, ble akseptert, 5) hunden kunne ikke ha påvist annen lungesykdom enn evt. lungemetastaser.

Studiedesignet innebar at to kasus skulle ha osteosarkom i det appendikulære skjelettet og ett kasus (kontrollhunden) kunne ikke ha kreftsykdom, men annen sykdom ble akseptert. Det ene osteosarkomkasus skulle ha makroskopisk lungemetastase(r) ved obduksjon, mens det andre kasus ikke skulle ha synlig sikre makroskopiske lungemetastaser ved obduksjon.

### ***Kliniske karakteristika av de inkluderte kasus***

***Hund 1: Rottweiler hann 50kg, 9år. Obduksjonsnr 13/28:*** Avlivet 15.05.2013 grunnet osteosarkom, og obdusert innen 1,5 time etter avliving. Tumoren var lokalisert i ulna på venstre forbein, og målte 10 x 8 x 7 cm. Det var hevelse i området for tumoren, men huden var intakt. Se bilde 1a og b i Vedlegg . Potet på det affiserte benet var ødematøs og hoven.

**Hund 2: Rottweiler tisper 44kg 9år. Obduksjonsnr. 13/65:** Avlivet 7.9.2013 grunnet osteosarkom og obdusert innen 1,5 time. Primærsvulst 5x7cm lokalisert proximalt i venstre humerus. Se bilde 2a og b i Vedlegg. Den venstre prescapulære lymfeknuten var noe forstørret. Obdusert samme dag.

**Hund 3: Vorstehhund strihåret, tisper. Obduksjonsnr. 16/58:** Avlivet grunnet mistanke om pyometra, og obdusert innen 1,5 time etter. Ved obduksjon viste det seg at tisperen hadde enkelte små svulster i en jurkjertel som ikke var oppdaget klinisk før avliven. Det ble tatt prøve av dette vevet som etter histologisk undersøkelse ble vurdert som adenom med noen maligne trekk (personlig meddelelse Jon Teige, 2016).

### ***Lungemateriale***

**Hund nr. 1, 13/28:** I alle lungelapper fantes det faste dannelser man mistenkte kunne være metastaser. Det var over 30 stk totalt, diffust fordelt i lungelappene. Dannelsene varierte i størrelse fra < 1 mm til 1,8 cm i diameter. De virket velavgrensede fra lungevevet. Se Figur 3 i Vedlegg. Enkelte av de største prominerte på overflaten. I kraniale deler av lungene var det noe atelektase.

**Hund nr. 2, 13/65:** Det ble ikke funnet noen synlige eller palperbare metastaser i lungevevet ved obduksjon. Lungene hadde normal farge og konsistens i vevet.

**Hund nr. 3, 16/58:** Lungene var blodtomme og litt små. Det ble ikke funnet synlige eller palperbare metastaser i lungene. En liten flekk 1 mm x 1 mm av hvit plakk ble funnet på overflaten av høyre kraniale lungelapp.

Figur 1: oversikt over lungenes lapper og benevning av disse.

**Prøvene ble merket etter følgende system:**

Obduksjonsnr.

A: venstre kraniale lungelapp

B: venstre midtre lungelapp

C: venstre kaudale lungelapp

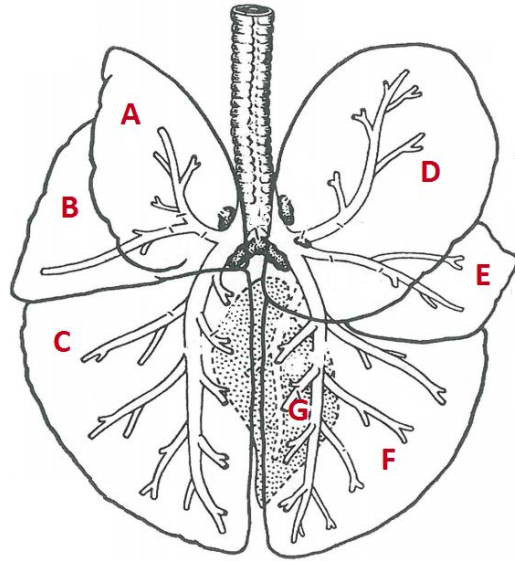
D: høyre kraniale lungelapp

E: høyre midtre lungelapp

F: høyre kaudale lungelapp

G: aksessorisk lungelapp

c/centrolobulært eller p/perilobulært



## **Metoder**

### **Obduksjon**

Hundene ble obdusert innen 2 timer etter avlaving med pentobarbital intravenøst.

Hundene ble obdusert på patologen, og det ble hentet ut prøver fra samtlige lungelapper, både fra perifere og sentrale deler av hver lapp. Det ble også tatt ut vevsprøver av andre organer, blant annet lymfeknuter, hjerte, lever og nyrer, samt prøver ved tegn til potensiell organpatologi. Hos hundene med diagnostisert osteosarkom ble det også hentet ut flere prøver av primærtumoren. Vevsprøvene var omtrent 1 x 1 cm store, og ble umiddelbart lagt på formalinløsning 1:10.

### **Histologisk undersøkelse**

### **H.E. - standard Hematoxylin-Eosin fargemetode.**

**Hund nr. 1, 13/28:** Tydelige metastatiske celler i snitt fra lungemetastaser ved HE.

**Hund nr. 2, 13/65:** I lungene ble det kun funnet noen få, små knuter av store celler, og det er usikkert om dette dreier seg om en metastase. Antrakose. Primærtumoren ble beskrevet som en svært uregelmessig og infiltrerende svulstprosess lokalisert under leddbrusken. Den bestod av spredte osteoide trabekler med et cellerikt vev rundt. Cellene hadde runde til uregelmessige kjerner, med moderat til tydelig kromatininnhold. Diagnostisert som osteosarkom av osteoblastisk type.

**Hund nr. 3, 16/58:** I lungene var det enkelte områder med emfysem og flere områder med moderate til tydelige stuvningsforandringer. Noen bronkieforgreininger hadde fibrose i veggen, enkelte av disse hadde også makrofager og slim i lumen. Uterusveggen var fortykket og hadde en diffuse infiltrasjon av nøytrofile celler i endometriet og i store deler av muskularis. Mammatumor med tallrike lobuli i varierende størrelse, de fleste omgitt av en tydelig bindevevskapsel. Enkelte lobuli er cystisk omdannet, mens det i andre ses mindre kjertelstruktur omgitt av bindevev. Kjertelvevet viser tegn til uregelmessig vekst og kan vise en tendens til infiltrativ vekst. Enkeltcellene har et pleomorft utseende. Diagnose: Adenom med maligne trekk.

### ***Immunhistokjemi***

Immunhistokjemi er en metode der man benytter seg av et antistoff til å merke celler eller vev for å påvise et spesielt antigen.

### ***Innstøping av tumorvev og lungevev og snitting***

Prøvematerialet ble så innstøpt i parafinvoks. Det ble produsert vevssnitt med tykkelse 2µm, henholdsvis 3 superfrost-P snitt til immunhistokjemi og 1 snitt til HE-farging per vevsprøve. Samtlige lungelapper er representert med sentral og perifer prøve. Snittene ble oppbevart i varmeskap 37 °C frem til farging. De snittene som ikke skulle farges innen noen døgn ble oppbevart i kjøleskap. Et snitt av hver prøve

ble farget med Hematoxylin-Eosin i fargemaskin på histologilaben, og montert med dekkglass. Enkelte av prøvene fra de andre organene er kun farget med HE.

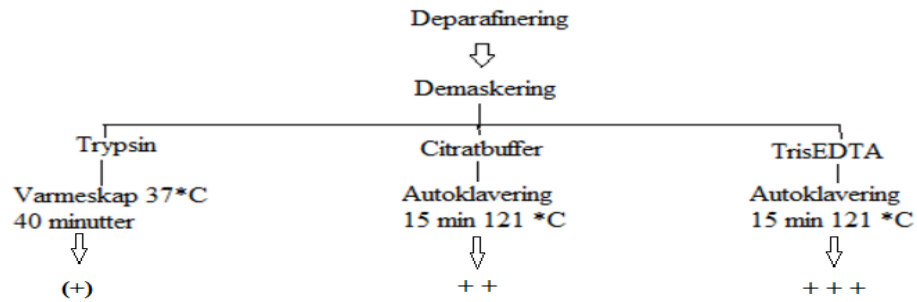
### ***Farging av lungesnitt og primærtumorsnitt med TP-3***

Det ble først farget et sett snitt for å undersøke hvilken fortykning som gav best resultater. Til dette brukte vi snitt fra primærtumoren fra begge hundene med osteosarkom. Det ble valgt ut 3 ulike demaskeringsprosesser; trypsin i varmeskap og citratbuffer/TrisEDTA i autoklav (Se prosedyre i Vedlegg). I tillegg ble det valgt ut 3 ulike konsentrasjoner av TP3; hhv 1:50, 1:100 og 1:250, samt en blank kontroll. Disse ble valgt ut grunnet tidligere suksess med TP-3 i løsning 1:100 i forsøk ved Radiumhospitalet (1:100 = 10µg/ml TP-3). Alle konsentrasjoner og blanke prøver ble kjørt med de tre ulike demaskeringsprosessene.

Demaskering er nødvendig for å få fram epitopene i vevet. Ved formalinfiksering er vevet ofte forvrengt, slik at antigenene ikke er tilgjengelige for antistoffene man ønsker å bruke. Strukturene kan gjøres tilgjengelige igjen ved teknikker som PIER - Protease Induced Epitope Retrieval eller HIER - Heat Induced Epitope Retrieval. (58).

I vårt tilfelle forsøker vi både med protease i form av trypsin, og to ulike varmemetoder der snittene kokes i en buffer.

Figur 2: Skjematisk oversikt over de ulike demaskeringsmetodene som ble forsøkt og resultatet av disse. (+) Lite utslag. +++ stort utslag.



### ***Resultater prøvefarging***

Den initielle prøvefargingen viste at trypsin-demaskering ga få positive svar. Citrat ga en del positive utslag på TP-3, men fortsatt færre enn ønsket. TrisEDTA ga best resultater, med godt fargeutslag i primærsvulsten. Av konsentrasjonene ble det valgt å gå videre med 1:50, ettersom dette gav tydeligst utslag på prøvefargingen. Det vil også farges noen snitt i 1:100 som kan avleses og sammenliknes med 1:50.

(Se Tabell 2 i Vedlegg - "Fortynningsrekke og test av demaskeringer).

### ***Fremgangsmåte TP-3 farging***

Vi valgte i samråd med veiledere å jobbe videre med TrisEDTA som demaskering og konsentrasjon TP3 1:50.

Snittene stod først i varmeskap i 58 °C i 30 minutter, før deparaffinering uten varme i xylen-spritrekke-destillert vann. i fargemaskin. De ble så transportert i kaldt vann opp til immunlaboratoriet. Ved demaskering ble snittene satt over i Tris/EDTA med pH 9,1 og autoklavert i 15 min ved 121°C. De ble så skylt i destillert vann for deretter å stå i PBS (fosfatbufret saltvann) på rotasjonsmaskin i 10 minutter med bytte av PBS midtveis. Snittene ble så inhibert med 3% H2O2 i metanol i 10 min. De ble så skylt forsiktig i destillert vann og satt i PBS for nye 10 minutter med PBS-

bytte på rotasjonsmaskin. Ved blokkering tilsettes en løsning med N-geit (normalserum) fortynnet 1:50 i 5% BSA til snittene. Overflødig PBS ble ristet av snittene før man tilsatte 80-100 uL blokkering til hvert snitt og la dem i fuktkammer. Fuktkammer med lokk ble satt på rotasjonsmaskin i 20 min. Man skylte så ikke av blokkeringen før TP-3, primærantistoffet, ble tilsatt. Dette ble fortynnet i 1% BSA, og 80-100 uL primærantistoff-løsning ble tilsatt prøvesnittene før de ble satt tilbake i fuktekammeret på rotasjonsmaskinen for inkubering i 1 time. Etter inkubering ble snittene skylt med PBS og satt i PBS på rotasjonsmaskin i 2 x 5 min. Det sekundære antistoffet vi brukte heter EnVision+anti-mus HRP. Dette ble romtemperert og blandet godt før vi tilsatte et par dråper per snitt. De ble så satt i fuktkammer på rotasjonsmaskin i 30 minutter. Deretter en PBS skylling og PBS på rotasjonsmaskin i 2 x 5 min.

Snittene ble så fremkalt med AEC fremkallingsløsning. 1-2 dråper ble dryppet på hvert snitt, hvor man så ventet til det var kommet et tilfredsstillende fargesvar etter 9 minutter. Da skylte man dem i destillert vann for å stanse ytterligere farging. Snittene ble så kontrastfarget i Mayer's hematoxylin i 20 sekunder og skylt i destillert vann i 5 minutter. Snittene ble så montert med PVA/aquatex. Det ble farget snitt med TP3 i konsentrasjonene 1:50, 1:100 og noen blanke kontroller (uten primærantistoff, TP-3). Det ble farget snitt fra begge hundene med påvist osteosarkom, samt fra kontrollhunden i begge konsentrasjoner.

### ***Histologisk vurdering***

Snittene ble så undersøkt i mikroskop. Det ble laget et system for å vurdere fargegraden i vevet og kvaliteten på fargingen, se tabell "Skala for vurdering av TP-3 farging" under. Det ble brukt en skala fra 0 - 5. Cellespesifikt fargeutslag ble gradert 1-3. Verdi 4 og 5 ble benyttet for snitt der det var positive celler, men også noe eller kraftig overfarging av vevet, som dermed ga artefakter. Ingen farge i det hele tatt ble gitt verdien 0. En skala for artefakter uten positive celler ble også laget, fra -1 til -4. Artefakter vil si avleiring av farge uten at det er tilknyttet spesifikke celler. Dette ses

som kraftig fargede flekker, klumper av fargerester eller diffuse områder med varierende farge.

Tabell 1: skala for fargeutslag ved TP-3 farging.

<b>Skala for vurdering av TP-3-farging</b>	
0	Intet utslag, ingen artefakter
1+	Noe positivt utslag
2+	Moderat positivt utslag
3+	Kraftig positivt utslag
4+	Positivt utslag, men noe overfarget
5+	Positivt utslag, men kraftig overfarge
-1	Intet utslag, få artefakter
-2	Intet utslag, moderat mengde artefakter
-3	Intet utslag, mye artefakter
-4	Intet utslag, svært kraftige artefakter

### ***Feilkilder:***

**Dårlig spesifisitet** - At TP-3 binder til andre celler enn tumorceller.

**Dårlig sensitivitet** - At TP-3 ikke binder til tumorceller som er tilstede i vevet

**Ikke optimal fikserings metode**- formalinfiksering og ikke frysesenitt. Ulike fikseringer påvirker vevet og epitopene forskjellig.

**Dårlig standardisering** - Forutsetningene er ikke like hver gang farging utføres.

**Kryssreaksjoner** - Antistoffet reagerer med uønskede antigener



**Fiksering** - Ufullstendig fiksering der ikke hele snittet er penetrert av formalin kan forårsake uspesifikk binding eller falsk negativt resultat grunnet tap av antigener.

**Fargefeil** - Feil underveis i fargeprosessen; dette kan f.eks være regnefeil, at man ikke skylt av farge, feil eksponeringstid for ulike kjemikalier m.m.

**Artsforskjeller** - Antistoffet er primært brukt på humant vev tidligere

**Ikke optimal demaskeringsmetode** - Kan selvsagt ha påvirket resultatet.

**Ikke optimal konsentrasjon av TP-3** - Her hadde vi både en anbefaling fra produsent og erfaringer fra tidligere å støtte oss på, men vi måtte prøve oss frem med ulike konsentrasjoner for å se hva som ville fungere best i vårt forsøk.

**Feil i produksjon og oppbevaring av kjemikalier** - Kjemikalier og antistoffer kan også ha blitt håndtert og oppbevart feil under transport, eller det kan foreligge feil fra produsentens side.

**Evalueringbias/Vurderingsskjevhet** - Vurdering av farge, fargeintensitet og artefakter i et vev er subjektivt. Den som avleser resultatene kjenner også allerede til de ulike hundene og hvem som har osteosarkom og ikke.

**Erfaring og kunnskap** - Viktig i hele prosessen, spesielt ved vurderingen av snittene.

**Negativ kontroll er ikke negativ** - En viktig feilkilde, spesielt i en liten studie som vår der det bare er én negativ kontroll.

## Resultater

Den immunhistokjemiske TP-3-fargingen fungerte godt på de to hundene som hadde osteosarkom, og TP3 merket unormale celler i lungesnittene. Hos kontrollhunden var det fleste lungesnittene negative med ingen innmerking av TP3, men i tillegg var noen celler i et par av lungesnittene på kontrollhunden også positive.

**Hund med osteosarkom og synlige lungemetastaser (Hund nr.1):** Hadde fargeutslag fra 1+ til 3+ på skalaen. Tabell 3 i Vedlegg viser en oversikt over alle snittene fra denne hunden, fargekonsentrasjonen og hvilken fargegradering de har fått. Flest snitt fikk gradering 2+, altså moderat positivt utslag på celler uten overfarging; tilsammen 7 snitt fikk denne graderingen. Kun et snitt fikk gradering 3+. Et av snittene hadde et usikkert utslag og fikk dermed ingen vurdering. Figur 6a i Vedlegg et viser en lungemetastase farget med immunhistokjemi TP-3 som farger i varierende grad. Snittet har fått vurdering 2+ siden den har spesifikk farging av celler. 6b viser positivt utslag med fargede celler spredt i septa, det er også en ansamling av celler som mulig kan være en metastase. Det var også liknende ansamlinger andre steder i snittet.

**Hund med osteosarkom uten synlige lungemetastaser (Hund nr. 2).** Tabell 4 og 5 i Vedlegg viser en oversikt over alle snittene fra denne hunden, fargekonsentrasjonen og hvilken fargegradering de har fått. Snittene fra denne hunden ble først farget med konsentrasjon 1:50. Disse ble generelt overfarget, men man kunne fortsatt se tydelig spesifikk farging av celler. Det var flere lungesnitt der vi også kunne se ansamlinger eller små knuter av positive celler. Fargeutslagene varierte fra gradering 1- til 5+. Flest snitt ved konsentrasjon 1:50 fikk 4+, altså positivt utslag med noe overfarget, hele 15 snitt fikk denne graderingen. Ved denne konsentrasjonen var det også mange som fikk gradering 5+ med mye overfarging. På grunn av den generelle overfargingen ble det gjort en ny farging, med konsentrasjon av TP3 1:100. Grunnet tid og kostnader kunne ikke samtlige snitt fra hund nr. 2 farges. Et utvalg basert på mistanke om metastaser ble valgt ut og farget på nytt. Resultatene her var av bedre kvalitet, med mindre artefakter og overfarging. Også her var det immunopositive celler i alveolene i de fleste snittene. Ved 1:100 var det flest snitt som fikk gradering

2. Et snitt fikk graderingen -1. Resultatene fra 1:100 samsvarte i stor grad med resultatene fra samme snitt farget med 1:50. Figur 7a viser et snitt med gradering 4+. Man kan se tydelig farging av celler, men også noe diffus overfarging utenom cellene. De fargede cellene er antatt å være tumorceller. Figur 7b har en mindre grad av overfarging, men har mange positive celler og har fått gradering 2+.

**Kontrollhund uten osteosarkom (Hund nr. 3).** Snittene fra dette kasuset hadde fargeutslag fra -3 til 4. Tabell 6 i vedlegg viser en oversikt over alle snittene fra kontrollhunden samt de ulike graderingene vi har gitt dem. Det var noen snitt med spesifikk farging av celler, men flesteparten hadde ikke spesifikk farging, og regnes derfor som negative. Noen av dem med spesifikk farging hadde utslag på kjerne, og ikke cytoplasma slik cellene hos de to andre hundene hadde. Også her var det en del artefakter og overfarging som vanskeliggjorde tolkningen. Figur 8a viser et negativt snitt, snittet inneholder noen artefakter og har derfor fått gradering -1. 8b viser et snitt fra kontrollhunden hvor vi har fått mye spesifikk farging av cellekjerner, men også noe cytoplasma har tatt farge. Snittet er noe overfarget og har fått gradering 4+. Alle de negative kontrollsnittene, uten TP-3 antistoff, var helt negative. Se Figur 9 i Vedlegg .

Vi så en tendens til at det hos hunden med synlige metastaser var mindre enkeltvis fargede celler i områdene rundt metastasene. Hos hunden med osteosarkom, men uten synlig metastaser var det generelt mere spredte positive celler, og de små TP3-positive celleansamlingene og knutene lå i områder der det generelt var mer positive celler i alveolene.

## Diskusjon

Den immunhistokjemiske undersøkelsen viste at osteosarkomcellene i lungene ble farget av TP3-antistoffet hos hund nr.1 som hadde osteosarkom i distale ulna med makroskopisk metastase synlig på røntgen og ved obduksjon. Metastasene som allerede var observert på HE-snittene tok tydelig farge, og både konsentrasjonen 1:50 og 1:100 av primærantistoffet viste en spesifikk farging av cellene. Det ble også sett flere små celleansamlinger som også var immunopositive. Det er grunn til å tro at dette er begynnende metastaser.

Det var også en del enkeltceller omkring i alveolene som ga immunopositivt signal. Disse cellene ligger i septa, og har tydelig farget cytoplasma. Form og størrelser varierer. Disse ble sett hos begge hundene med osteosarkom, i varierende mengder. I noen av snittene fra kontrollhunden ble det imidlertid funnet liknende eller tilsvarende TP3-positive celler. Vi kan ikke på dette stadiet si noe om at disse cellene er normale celler tilstede også hos friske hunder eller om de er sarkomceller. For å finne ut det må man gjøre en større undersøkelse med lungevev fra flere friske hunder.

Noen av de immunopositive cellene hos kontrollhunden kan vi morfologisk bestemme, blant annet ser vi at slimproduserende begerceller i luftveiene og glatte muskelceller tar farge. Enkelte celler som ligger i alveolene er imidlertid også immunopositive, hvilket vi ikke kan forklare. Av 13 snitt som kunne vurderes er det 5 snitt med spesifikt fargede celler i alveolene, som følgelig må regnes som positive. Også hos kontrollhunden var overfarging og artefakter hyppig forekommende, og gjorde tolkningen utfordrende. Den subjektive evalueringen av snittene har stor betydning, og evaluerings bias kunne blitt redusert ved bruk av en blindet avlesning, hvor personen ikke visste hvilken hund snittene kom fra.

De blanke snittene uten primærantistoff viste ingen farging, noe som tyder på at det er TP3 som gir denne fargingen og ikke andre steg i metoden.

Vi ser en tydelig trend med kraftigere farging og flere positive snitt hos de to hundene med osteosarkom, men resultatene fra kontrollhunden og fargingen av normalt vev gjør at vi ikke kan si at TP-3 er osteosarkom-spesifikt. Hos alle de tre hundene ses det også farging av begercellene i luftveienes epitel, og av glatte muskelceller i karveggene. Disse celletypene er imidlertid mulige å morfologisk skille fra potensielle metastatiske celler. Farging av normalt vev hos hund er også sett i tidligere forsøk med TP-3. (59).

I snittene med tydelige metastaser er det gjennomgående at de mindre metastasene farges bedre og kraftigere enn de som er større. Hos metastaser som dekker mer enn et helt 40x felt i mikroskopet er det påfallende ofte cellene i randen av svulsten som tar farge, eller som farger tydeligst. Her ser vi også en tendens til at det er færre fargede celler som ligger enkeltvis i området rundt. Dette kan ha noe med metoden og tap av epitoper å gjøre, eller en tumorbiologisk forklaring. Vi observerte også noe færre TP-3 positive celler i alveoleseptiene rundt tumorer av en viss størrelse. Denne tendensen så man derimot ikke hos hunden uten synlige metastaser hvor de positive cellene var mere tilfeldig spredt i hele vevet. Denne tendensen er kanskje ikke av betydning ettersom utvalget er veldig lite, men det er et interessant funn.

Tidligere analyser med TP-3 er gjort på frysensnitt, og det er kjent at formalin og innstøpingen i parafin ødelegger noen av de antigene epitopene (personlig meddelelse Øyvind Bruland, 2016). At vi likevel har en god farging av både primærtumor og antatte lungemetastaser betyr at en god del av epitopene er bevart gjennom prosessen.

I ett av snittene fra kontrollhunden (snitt nr. LH1p) ligger de TP3-positive cellene tidvis i små ansamlinger, der flesteparten er spesifikt farget. En av våre hypoteser er at dette er inflammatoriske celler, alveolemakrofager, eller det kan være metastaser fra juret, da TP-3 har vist seg å ikke være like osteosarkom-spesifikt hos hund som hos menneske. (59).

En rekke ulike faktorer kan ha bidratt til at resultatene ble inkonklusive. Frysensnitt er regnet som det ideelle utgangspunktet for farging med TP-3. At vi har tydelig positive resultater er derfor et godt tegn, ettersom vi har benyttet formalinfikserte

snitt som kan være en mindre egnet metode. Formalinen kan påvirke epitopene og gjøre dem mindre tilgjengelige ved å vaske dem bort eller endre dem på annen måte. Det ville derfor vært svært interessant å forsøke samme prosedyre med frysesnitt og se om resultatene ble anderledes.

Det er sannsynlig at valget av 1:50 som videre fargemetode ikke var ideelt, da mange av snittene ble svært overfarget og dermed vanskelige å tolke. Det ble forsøkt å farge noen snitt med TP3 1:100 ved neste farging, med bedre resultater.

Det var praktisk å bruke primærtumoren i fortynningsrekken fordi dette var et vev vi etter all sannsynlighet ville få utslag i. Vi burde også ha inkludert noen antatt positive lungesnitt, siden det var denne typen vev vi senere skulle benytte metoden på. Valg av demaskeringsprosess kan også være en feilkilde. Vi hadde muligheten til å utprøve 3 ulike metoder og velge den vi anså for å være best. I andre farginger ved Radiumhospitalet er det blant annet benyttet aceton i demaskeringen personlig meddelelse Jan Nesland & Øyvind Bruland, 2014).

Testfargingen var også første gang vi brukte immunhistokjemisk metode, og både utstyr og teknikker var ukjente for oss. Kunnskap og erfaring er viktig for å kunne ta gode avgjørelser, og når verken vi eller de ansatte på laboratoriet hadde arbeidet med TP3 tidligere var det av og til vanskelig å bedømme resultater og gjøre gode valg basert på disse.

Standardisering er også en feilkilde, og en viktig faktor gjennom hele prosessen fra obduksjon til tolkning av de fargede snittene. Flere personer har utført arbeidet, fargingen er gjort på forskjellig datoer og derfor med forskjellige batcher av de ulike reagensene. Det ble etterhvert også brukt to ulike konsentrasjoner av antistoff. De tidsavhengige delene i fargeprosessen var spesielt vanskelige å standardisere, fordi det er vanskelig å sørge for at samtlige snitt eksponeres for farge eksakt like lenge. Vi brukte stoppeklokker og forsøkte å måle arbeidstiden for hvert enkelt snitt, og ellers standardisere metodene så langt det var mulig ved å strengt følge oppskriften.

Ved eksponeringen med AEC måtte vi observere i mikroskop underveis og skylle av reagensen når snittet var tilstrekkelig farget. Oppgitt tid for dette fra produsent var 5-

20 minutter, og i testfargingen kom vi frem til at ideell tid for TrisEDTA-snittene av primærtumor var rundt 9 minutter. Vi forsøkte derfor å følge dette ved videre farginger, selv om denne vurderingen ble tatt uten å kjenne fargingen godt. Igjen kan det hende vi hadde kommet frem til noe annet om lungevev hadde vært inkludert ved testfargingen.

Valg av negativ kontroll representerer en mulig feilkilde i denne studien. Det viste seg at kontrollhunden, en eldre tisper avlivet grunnet pyometra, hadde svulster i juret. Mammatumoren vi hentet ut ble beskrevet som benign utfra HE-snitt. Kravet om kreftfrihet hos kontrollen er dermed ikke oppfylt, men hunden ble tatt med i studien likevel grunnet lite tid og ressurser. For bedre sikkerhet burde vi forkastet kontrollhunden, og eventuelt også hatt med flere negative kontroller i studien.

At det skulle foreligge en feil med kjemikalier eller serum er lite sannsynlig, da andre på det histologiske laboratoriet har benyttet normalserum fra geit og de samme løsningene uten problemer i det samme tidsrommet. Antistoffet har imidlertid vært fryst og tint noen ganger, og kvaliteten kan derfor ha blitt forringet, men det har vært vanlig prosedyre med TP3-bruksløsningen (personlig meddelelse Jan Nesland & Øyvind Bruland). Det kan også hende at antistoffet har begrensninger hva gjelder artsspesifisitet. Det er ukjent hvor godt fargen fungerer på hunder. Bruland *et al.* 1988 beskriver kraftig, homogen farging av lungemetastaser på frysensnitt i sine forsøk, i kontrast til hva vi ser i vår undersøkelse med formalinfikserte snitt. Avgjørende kan her være prepareringen av vevet eller at Bruland *et al.* Ikke har undersøkt nok hundevsprøver i sine studier.

## Konklusjon

Vår pilotstudie viser at antistoffet TP-3 har sensitivitet for osteosarkomceller hos hund, både i primærtumor og i lungemetastaser. Det ble sett en sammenheng mellom større metastaser og få positive celler i området rundt disse hos hunden med synlige metastaser, mens de positive cellene var mere spredt hos hunden uten synlige metastaser. Det ville derfor vært interessant å se om denne tendensen også finnes hos andre hunder med osteosarkom, eller om det er en tilfeldighet hos våre to kasus. I vårt studium observerte vi positiv TP3-farging av andre celletyper i lungevevet, og også kontrollhunden hadde noen immunopositive celler selv om de fleste snitt var negative. Vi har ikke avdekket årsaken(e) til at kontrollhunden hadde slike områder i enkelte snitt. Spesifisiteten er derfor ikke så god som ønsket i studien. Det er ingen tvil om at det er TP-3 som gir binding og fargeutslag, da de negative kontrollene er helt negative.

Hvis metoden skal brukes videre er bedre spesifisitet ønskelig. En bør da undersøke hvilke celletyper de immunopositive cellene tilhører, og eventuelt benytte seg av teknikker for å hindre de normale cellene i å ta farge. Ettersom det i tidligere forsøk har vært brukt frysensnitt med gode resultater ville det vært interessant å prøve dette også på hund og se om resultatene samsvarer bedre.



## **Takk til:**

Først og fremst vil vi takke våre veiledere Lars Moe og Erling Olaf Koppang som har introdusert oss for temaet og hjulpet oss både med tolkning av snitt, praktiske løsninger og delt av sin fagkunnskap.

Stor takk til Mari Aas Ådland for god opplæring i immunhistokjemi, og alle de andre på histolab for god hjelp og nyttige tips på veien - Alexandra, Laila, Sigbjørn m.fl.

Takk til Smådyrklubben for formidling av aktuelle kasus til oppgaven vår, og takk til patologen som har vært fleksible og latt oss bruke deres lokaler.

Grunnarbeid og innsamling av kasus i 2013 ble gjort av Kjetil Dahl, Jon Teige, Lars Moe med flere. Vi er takknemlige for å ha fått bruke dette materialet, og setter pris på det grundige forarbeidet som er gjort. Vi retter også en stor takk til eiere som har donert materialet og gjort det mulig å forske på denne spesielle krefttypen. Vi er også svært takknemlige for å ha mottatt et stipend fra Forskningsfondet kreft hos hund i forbindelse med denne oppgaven.

## Summary

*Title:* Canine osteosarcoma: TP-3 as a detection method for pulmonary micrometastasis

*Authors:* Anne H. Nornes and Sara M. Solheim

*Supervisor:* Lars Moe at Department of Companion Animal Clinical Sciences and Erling Olaf Koppang at Department of Basic Sciences and Aquatic Medicine.

Osteosarcoma is an aggressive malignant neoplasm, and is the most common primary bone tumour in both dogs and humans. The tumour rapidly metastasizes, primarily to the lungs. Despite new treatment options, the mortality is still considerable in humans - and over 90 % in dogs. The cancer deaths are mainly connected to metastatic disease. Few of the canine patients shows any clinical or radiological signs of metastasis at the time of diagnosis - but despite amputation of the diseased limb, 85 % of the dogs will develop lung metastases in the following months. This indicates that the metastatic process starts at a very early stage of the disease.

In this pilot project, we investigated whether the monoclonal antibody TP-3 could be used as a marker for such metastatic disease of the lungs in dogs with primary osteosarcoma. We sampled lung tissue from three dogs:

Case 1 - a dog with osteosarcoma and visible lung metastases

Case 2 - a dog with osteosarcoma, but no detectable lung lesions

Case 3 - a presumably cancer free dog as a negative control

We used immunohistochemical methods to stain the samples. Our results shows a presumable affinity to metastatic tumour cells, demonstrated in both the cases with osteosarcoma. There are, however, some clearly TP-3 positive cells in the negative control. The project would thus need refining, a more systematic approach and a wider sample selection to produce valid results.

## Referanser:

1. Morello E, Martano M, Buracco P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: Similarities and differences with human osteosarcoma. *The Veterinary Journal*. 2011;189(3):268-77.
2. MacEwen EG. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metast Rev*. 1990;9(2):125-36.
3. Fenger JM, London CA, Kisseberth WC. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2014;55(1):69-85.
4. Bruland OS, Hoifodt H, Saeter G, Smeland S, Fodstad O. Hematogenous micrometastases in osteosarcoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(13):4666-73.
5. Kirpensteijn J. Canine osteosarcoma. 2003;13(1):39-51.
6. Klepp BRTSO. kreft store medisinske leksikon22.10.2014. Available from: <https://sml.snl.no/kreft> hentet 20/9-15.
7. Klepp O. Osteosarkom store medisinske leksikon2009 [cited Hentet]. Available from: <https://sml.snl.no/osteosarkom> Hentet 20/9 2015.
8. Klepp O. metastase store medisinske leksikon2009. Available from: <https://sml.snl.no/metastase> Hentet 20.09.2015.
9. Roald B. immunhistokjemi store medisinske leksikon2009. Available from: <https://sml.snl.no/immunhistokjemi> hentet: 20.09.2015.
10. Eide SESTJ. Gastrointestinal stromal tumor *Tidsskr Nor Lægeforen* 2003; 123:1191–32003. Available from: <http://tidsskriftet.no/article/802333/> hentet 20.09.2015.
11. Spill FG, Pilar; Alarcon, Tomas; Maini, Philip K.; Byrne, Helen M. Mesoscopic and continuum modelling of angiogenesis. *journal of Mathematical Biology* February 2015. 2014;70(3):485-532.

12. integriner store norske leksikon. Available from:  
<https://snl.no/.search?query=integrin&x=0&y=0> hentet 09.03.16.
13. Cellesyklus UiO Institutt for biovitenskap: UiO Institutt for biovitenskap; 2011. Available from:  
<http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/c/cellesy.html>  
hentet 09.03.2016.
14. Ru G, Terracini B, Glickman LT. Host related risk factors for canine osteosarcoma. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 1998;156(1):31-9.
15. Shearin AL, Ostrander EA. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Disease models & mechanisms*. 2010;3(1-2):27-34.
16. Tjalma RA. Canine Bone Sarcoma: Estimation of Relative Risk as a Function of Body Size. *Journal of the National Cancer Institute*. 1966;36(6):1137-50.
17. MacEwen Wa. *Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. st. louis: Elsevier saunders; 2013. 750 p.
18. Phillips JC, Stephenson B, Hauck M, Dillberger J. Heritability and segregation analysis of osteosarcoma in the Scottish deerhound. *Genomics*. 2007;90(3):354-63.
19. Cooley DM, Beranek BC, Schlittler DL, Glickman NW, Glickman LT, Waters DJ. Endogenous Gonadal Hormone Exposure and Bone Sarcoma Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2002;11(11):1434-40.
20. Thomas R, Wang HJ, Tsai P-C, Langford CF, Fosmire SP, Jubala CM, et al. Influence of genetic background on tumor karyotypes: evidence for breed-associated cytogenetic aberrations in canine appendicular osteosarcoma. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2009;17(3):365-77.
21. Fieten H, Spee B, Ijzer J, Kik MJ, Penning LC, Kirpensteijn J. Expression of hepatocyte growth factor and the proto-oncogenic receptor c-Met in canine osteosarcoma. *Veterinary pathology*. 2009;46(5):869-77.
22. Fan TM, Barger AM, Sprandel IT, Fredrickson RL. Investigating TrkA expression in canine appendicular osteosarcoma. *Journal of veterinary*

internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine.

2008;22(5):1181-8.

23. Kow K, Thamm DH, Terry J, Grunerud K, Bailey SM, Withrow SJ, et al. Impact of Telomerase Status on Canine Osteosarcoma Patients. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008;22(6):1366-72.

24. Ren L, Khanna C. Role of ezrin in osteosarcoma metastasis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;804:181-201.

25. Charles D. Newton DVM, M.S. and David M. Nunamaker. *Textbook of Small Animal Orthopaedics*: J.B. Lippincott Company; 1985.

26. Polverosi R, Maffessanti M, Zompatori M, Dalpiaz G, Pesci A, Cancellieri A. *Diffuse Lung Diseases: Clinical Features, Pathology, HRCT*: Springer; 2007.

27. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

28. Maniscalco L, Iussich S, Morello E, Martano M, Biolatti B, Riondato F, et al. PDGFs and PDGFRs in canine osteosarcoma: new targets for innovative therapeutic strategies in comparative oncology. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2013;195(1):41-7.

29. Loukopoulos P, Thornton JR, Robinson WF. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. *Veterinary pathology*. 2003;40(3):237-48.

30. Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM, Reynolds LE. Integrins: The Keys to Unlocking Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28(10):1703-13.

31. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 2009;19(5):329-37.

32. Bagri A, Kouros-Mehr H, Leong KG, Plowman GD. Use of anti-VEGF adjuvant therapy in cancer: challenges and rationale. *Trends in Molecular Medicine*. 2010;16(3):122-32.

33. D Ribatti<sup>1</sup> BN, E Crivellato<sup>2</sup>, A M Roccaro<sup>3</sup> and A Vacca<sup>3</sup>. The history of the angiogenic switch concept. 2006.

34. Alberts B JA, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

35. Lv Y-f, Dai H, Yan G-n, Meng G, Zhang X, Guo Q-n. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3 $\beta$ ;-catenin/Snail signaling pathway. *Cancer Letters*.373(2):164-73.
36. Strauss SJ, Ng T, Mendoza-Naranjo A, Whelan J, Sorensen PH. Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma. *The oncologist*. 2010;15(6):627-35.
37. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *International Journal of Cancer*. 2008;123(9):1991-2006.
38. Paget S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*. 1889;133(3421):571-3.
39. Emmanouil Fokas RE-C, Kiriakos Daniilidis, Frank Rose, Han-Xiang An. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. 2007(3):705-15.
40. Sun YF, Yang XR, Zhou J, Qiu SJ, Fan J, Xu Y. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(8):1151-73.
41. Eberle N, Fork M, von Babo V, Nolte I, Simon D. Comparison of examination of thoracic radiographs and thoracic computed tomography in dogs with appendicular osteosarcoma. *Veterinary and comparative oncology*. 2011;9(2):131-40.
42. Armbrust LJ, Biller DS, Bamford A, Chun R, Garrett LD, Sanderson MW. Comparison of three-view thoracic radiography and computed tomography for detection of pulmonary nodules in dogs with neoplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012;240(9):1088-94.
43. Spodnick GJ, Berg J, Rand WM, Schelling SH, Couto G, Harvey HJ, et al. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992;200(7):995-9.
44. DYREETIKK RF. GRENSER FOR ETISK FORSVARLIG VETERINÆRBEHANDLING AV DYR UTTALELSE AVGITT MARS 2000.

Available from: <http://www.radetfordyreetikk.no/Utallelser/Grenser.HTM>

Hentet 01.04.2016.

45. Straw RC, Withrow SJ. Limb-Sparing Surgery Versus Amputation for Dogs with Bone Tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1996;26(1):135-43.
46. Straw RC, Withrow SJ, Richter SL, Powers BE, Klein MK, Postorino NC, et al. Amputation and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 1991;5(4):205-10.
47. Vail DM, Kurzman ID, Glawe PC, O'Brien MG, Chun R, Garrett LD, et al. STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2002;50(2):131-6.
48. Berg J, Weinstein MJ, Springfield DS, Rand WM. Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1995;206(10):1555-60.
49. Wilkins RM, Cullen JW, Camozzi AB, Jamroz BA, Odom L. Improved survival in primary nonmetastatic pediatric osteosarcoma of the extremity. *Clinical orthopaedics and related research*. 2005;438:128-36.
50. Bacci G, Picci P, Ferrari S, Ruggieri P, Casadei R, Tienghi A, et al. Primary chemotherapy and delayed surgery for nonmetastatic osteosarcoma of the extremities. Results in 164 patients preoperatively treated with high doses of methotrexate followed by cisplatin and doxorubicin. *Cancer*. 1993;72(11):3227-38.
51. Selvarajah GT, Kirpensteijn J, van Wolferen ME, Rao NAS, Fieten H, Mol JA. Gene expression profiling of canine osteosarcoma reveals genes associated with short and long survival times. *Molecular Cancer*. 2009;8:72-.
52. Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer research*. 2007;27(1a):155-64.
53. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog Models of Naturally Occurring Cancer. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(7):380-8.

54. LaRue SM, Withrow SJ, Powers BE, Wrigley RH, Gillette EL, Schwarz PD, et al. Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1989;195(12):1734-44.
55. Withrow SJ, Wilkins RM. Cross Talk from Pets to People: Translational Osteosarcoma Treatments. *ILAR Journal*. 2010;51(3):208-13.
56. Eikenes L, Bruland ØS, Brekken C, Davies CdL. Collagenase Increases the Transcapillary Pressure Gradient and Improves the Uptake and Distribution of Monoclonal Antibodies in Human Osteosarcoma Xenografts. *Cancer Research*. 2004;64(14):4768-73.
57. Bruland OS, Fodstad O, Stenwig AE, Pihl A. Expression and characteristics of a novel human osteosarcoma-associated cell surface antigen. *Cancer Res*. 1988;48(18):5302-9.
58. biologi Ulfo. Å gjøre antigen tilgjengelig UiO: UiO; 2009. Available from: <http://www.odont.uio.no/iob/om/organisasjon/fagavd/cellebiologi/rutiner-metoder/er.html> Hentet: 05.04.2016.
59. Haines DM, Bruland OS. Immunohistochemical detection of osteosarcoma-associated antigen in canine osteosarcoma. *Anticancer research*. 1989;9(4):903-7.



## Vedlegg

<b><i>Osteosarkom hos menneske og hund – sammenlikning (55)</i></b>		
<b><u>Variabel</u></b>	<b><u>Hund</u></b>	<b><u>Menneske</u></b>
<i>Gjennomsnittsalder</i>	7 år	14 år
<i>Kroppsvekt</i>	90 % er > 20 kg	Tunge
<i>Lokalisasjon</i>	77 % i lange rørknokler, metafyser. Distale radius > proximale humerus > distale femur > tibia	90 % i lange rørknokler, metafyser. Distale femur > proximale tibia > proximale humerus
<i>Etiologi</i>	Ukjent	Ukjent
<i>Begrenset til lem ved diagnosetidspunkt</i>	80-90 %	80-90 %
<i>Histologisk høygradige</i>	95 %	80-90 %
<i>DNA-indeks</i>	75 % aneuploide	75 % aneuploide
<i>Prognostiske indikatorer</i>	Alder, ALP	ALP, MDR1
<i>Metastaseringsgrad uten kjemoterapi</i>	90 % innen 1 år	80 % innen 2 år
<i>Metastaserer til</i>	Lunge > ben > bløtvev	Lunge > ben > bløtvev
<i>Bedret overlevelse ved kjemoterapi</i>	Ja	Ja
<i>Varighet av adjuvant kjemoterapi</i>	4-6 sykluser	Opp til 1 år
<i>Metastasering til regionale lymfeknuter</i>	Dårlig prognose, < 5 %	Dårlig prognose
<i>Kirurgisk behandling</i>	Amputasjon, artrodese	Besparende kirurgi





Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)

<b>Tabell nr. 2: Fortynningsrekke og test av demaskeringer</b>		
<b>Citratbuffer (1)</b>		
<i>Snitt</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
19 d - 1:50	4+	
19d - 1:100	2+	Variierende
19d - 1:250	1+	Variierende utslag
19d - blank	4-	
<b>TrisEDTA (2)</b>		
<i>Snitt</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
19d - 1:50	3+/2-	Veklsende +/-
19d - 1:100	2+/2-,	Periodevis 2+/3+
19d - 1:250	4-	Artefakter
19d - blank	4-	Likner 1:250
<b>Trypsin stamløsning (3)</b>		
<i>Snitt</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
19d - 1:50	4-	Artefakter
19d - 1:100	4-	Artefakter
19d - 1:250	1+, mest 3-	
19d - blank	4-	

**Tabell nr. 3: Hund nr. 1 - 13/28 (OSA +, synlige metastaser)**

<i>Snitt</i>	<i>TP3 fortynning</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
13/28 1 Ac	1:100	2+	Tydelige metastaser, tar farge noe varierende. Også + celler i vevet ellers, noen ansamligner - små metastaser?
13/28 2 Ap	1:50	2+	Små metastaser, men er tydelig farget. Også noe fargeutslag på celler i alveolesepta
13/28 3 Bc	1:50	3+	En metastase med god farging, noe + celler samt noe utslag i epitelceller
13/28 4 Bp	1:50	1+	Små + metastaser og en stor metastase med noe svakere fargeutslag
13/28 5 Cc	1:50	2+	Metastase med god farge, samt + celler. Fargeutslag i glatte muskelceller
13/28 6 Cp	1:50	2+	Metastase med god farge, en metastase mindre farget. + celler i alveoler, og utslag i fortykkede septa
13/28 7 Dc	1:50	Usikker	Lite fargeutslag, i rart område og usikker på om spesifikt. Septa noe fortykket, men ikke fargeutslag
13/28 8 Dp	1:50	1+	To antatte metastaser, men lite fargeutslag i disse
13/28 9 Ec	1:100	1+	En større metastase med lite utslag, samt artefakter. Også noe + celler i septa
13/28 10 Ep	1:100	2+	Tydelig farging av mange celler i alveolesepta, noen i ansamlinger som kan være mikrometastaser
13/28 11 Fc	1:100	1+	En mulig metastase som tar farge i kanten av snitte, ellers bare noen få + celler
13/28 12 Fp	1:100	2+	Noe fargede celler i septa, mulig en liten metastase med noe farge
13/28 13 Gc	1:100	1+	Stor antatt metastase, men lite fargeutslag. Noe artefakter/fargerester
13/28 14 Gp	1:50	2+	2 metastaser med god farge i kanten av snittet, ellers lite + celler

**Tabell nr. 4 - Hund nr. 2 - 13/65 (OSA +, ikke synlige metastaser)**

<i>Snitt</i>	<i>TP3 fortynning</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
13/65 1a Ac	1:50	2+	Positive celler, men også noe noe artefakter.
13/65 1b Ac	1:50	5+	Kraftig overfarget, mye fargerester. Positive celler med spesifikk farging
13/65 2a Ap	1:50	5+	Overfarget. Mange positive celler, samt en mulig metastase som farges
13/65 2b Ap	1:50	2+	Artefakter, men spredte positive celler og enkelte små knuter med mye + celler
13/65 3a Bc	1:50	4+	Artefakter og overfarging, men også celler som virker positive
13/65 3b Bc	1:50	4+	Artefakter og overfarging, men celler som virker +. Noe fortykkede septa
13/65 4 Bp	1:50	4+	Mye artefakter og overfarging, men også her positive celler. Dårlig kvalitet på snittet.
13/65 5a Cc	1:50	5+	Artefakter og overfarging, ciliert epitel har tatt farge. Generelt mye + celler i alveoler. Liten + knute.
13/65 5b Cc	1:50	5+	Overfarget, mye positive celler. Ikke tegn til + knuter
13/65 6a Cp	1:50	4+	Overfarget, en del + celler, mulig svært små + knuter/fortykkelser
13/65 6b Cp	1:50	4+	Overfarget, en del + celler, mulig også små + knuter/fortykkelser
13/65 7a Dc	1:50	4+	Artefakt og overfarging, en del + celler spredt rundt. Vanskelig å tolke.
13/65 7b Dc	1:50	5+	Overfarget og artefakter, men + celler og en + knute
13/65 8a Dp	1:50	4+	Overfarget/artefakter, men + celler. Ser ikke + knuter
13/65 8b Dp	1:50	4+	Overfarget, en del + celler, ikke sett + knuter

**forts. Tabell 4 - Hund nr. 2 - 13/65 (OSA +, ikke synlige metastaser)**

<i>Snitt</i>	<i>TP3 fortynning</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
13/65 9a Ec	1:50	4+	Overfarging, en del celler er +, ser også et + fortykket område
13/65 9b	1:50	5+	Overfarging og artefakter, men også mye + celler
13/65 10	1:50	4+	Overfarget, noen + celler
13/65 11a Fc	1:50	4+	Overfarget og artefakter, men + celler
13/65 11b Fc	1:50	4+	Overfarget, men generelt + celler
13/65 12a Fp	1:50	5+	Overfarget, mye + celler og noe + fortykkelser og knuter
13/65 12b Fp	1:50	4+	Overfarget, men en del + celler. Nor fort., ikke knuter
13/64 13a Gc	1:50	5+	Overfarget, men er mange + celler. Forurensning med levervev (?) farges også positivt.
13/64 13b Gc	1:50	4+	Overfarget, men ser + celler. Noe fortykninger som farger +, ingen konkrete knuter
13/65 14a Gp	1:50	4+	Overfarget og artefakter, mye + celler. Ikke knuter.
13/65 14b Gp	1:50	5+	Overfarget, mulig en + knute, fortykninger flere steder og generelt mye + celler

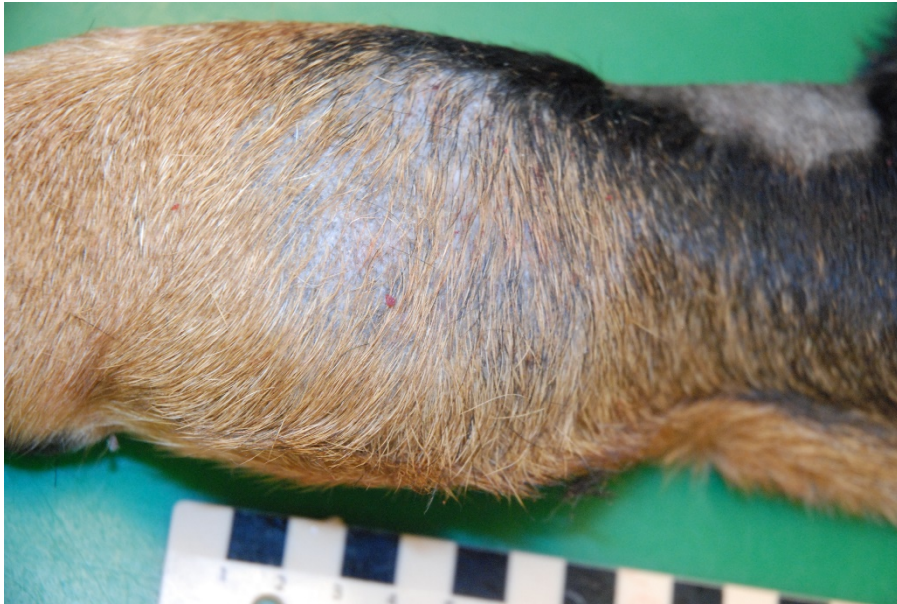
**Tabell nr. 5 - Refarging 1:100 av utvalgte snitt 13/28 og 13/65**

<i>Snitt</i>	<i>TP3-fortynning</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
13/28 1 Ac	1:100	2+	Positiv metastase og + celler rundt om i alveolene som ikke er begerceller eller glatt muskel. Tolkes som tumorceller.
13/28 6 Cp	1:100	2+	Positive metastaser, samt + celler rundt om i vevet som tolkes som tumorceller
13/65 2a Ap	1:100	Usikker	Noe artefakter, noen områder ser + ut, mulig positive celler. Måtte verifiseres med andre metoder.
13/65 2b Ap	1:100	2+	Metastase, er +. samt + celler rundt i vevet, ikke begerceller
13/65 3a Bc	1:100	2+	Artefakter, men også tydelig positive celler som ikke er muskel- eller begerceller
13/65 4 Bp	1:100	1+	Mye artefakter, men er noen + celler
13/65 5b Cc	1:100	1-	Fortetninger i vevet, men likner ikke metastaser. Svakt + celler, men er høyst sannsynlig negativ
13/65 6a Cp	1:100	4+	Moderate mengder + celler, og er også små + knuter. Noe overfarging/artefakter også.
13/65 6b Cp	1:100	4+	Tydelig + celler i moderate mengder, og er også små + knuter. Noe overfarging/artefakter også.
13/65 7b Dc	1:100	2+	Tydelig + celler i alveoler. En del overfarging noen steder. Liten + knute
13/65 9a Ec	1:100	2+	Tydelig + celler. Fortettet område inneholder + celler
13/65 12a Fp	1:100	4+	Overfarging. fortetninger som inneholder + celler som ikke er beger-/muskelceller.
13/65 12b Fp	1:100	4+	Positive celler i fortetning, + celler rundt i vevet. Klare tumorceller. Overfarging.
13/65 14b Gp	1:100	2+	Fortetting med + celler, mange + rundt i vevet
13/28 1 Ac	Negativ kontroll	0	Fullstendig negativ



**Tabell nr. 6 - Hund nr. 3 - 16/58 (OSA - kontroll)**

<i>Snitt</i>	<i>TP-3 fortynning</i>	<i>Resultat</i>	<i>Kommentar</i>
16/58 9 Dc	1:50	3-	Artefakter og fargerester. Ser begerceller som har tatt farge i en bit luftveiseepitel.
16/58 1 Dp	1:50	4+	Positiv, cellespesifikk farging av celler i alveolene. Primært kjernefarging, tilsynelatende ikke farging cytoplasma. Enkelte ansamlinger av kjerne + celler. Overfarget.
16/58 10 Ec	1:50	-	Kraftig overfarget, må ses bort fra
16/58 2 Ep	1:50	4+	Overfarget, men også mye celler med spesifikk kjernefarge. Også noen celler med positiv farging av cytoplasma.
16/58 3 Fp	1:50	4+ (1+/3-)	Overfarget og artefakter, men enkelte celler ser spesifikke ut
16/58 15 Gc	1:100	4+ (1+/3-)	Overfarget, utslag i glatt muskel- og begerceller, men også noen + celler i alveoler
16/58 7 Gp	1:100	4+ (2+/3-)	Noe åpenbare artefakter og fargerester, men også tydelig + celler i alveoler
16/58 12 Ac	1:50	2-	Mest artefakter, få celler som har tatt farge
16/58 4 Ap	1:100	2-	Artefakter, område med uspesifikt fargede celler
16/58 13 Bs	1:100	3-	Mye artefakter, ingen celler er definitivt +
16/58 5 Bp	1:100	1-	Få artefakter, ingen definitivt + celler
16/58 14 Cs	1:100	1-	Ser ut som få artefakter, mulig noe svakt + celler
16/58 6 Cp	1:100	1-	Noen få artefakter
16/58 16 (jursvulst)	1:100	2-	Artefakter og fargerester, ingen spesifikk farging



*Figur 3:*

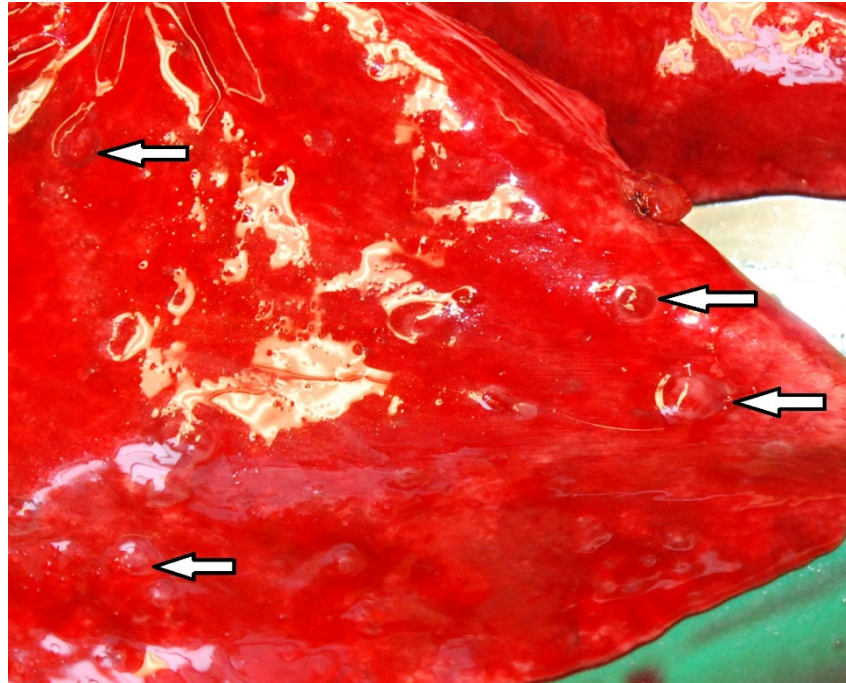
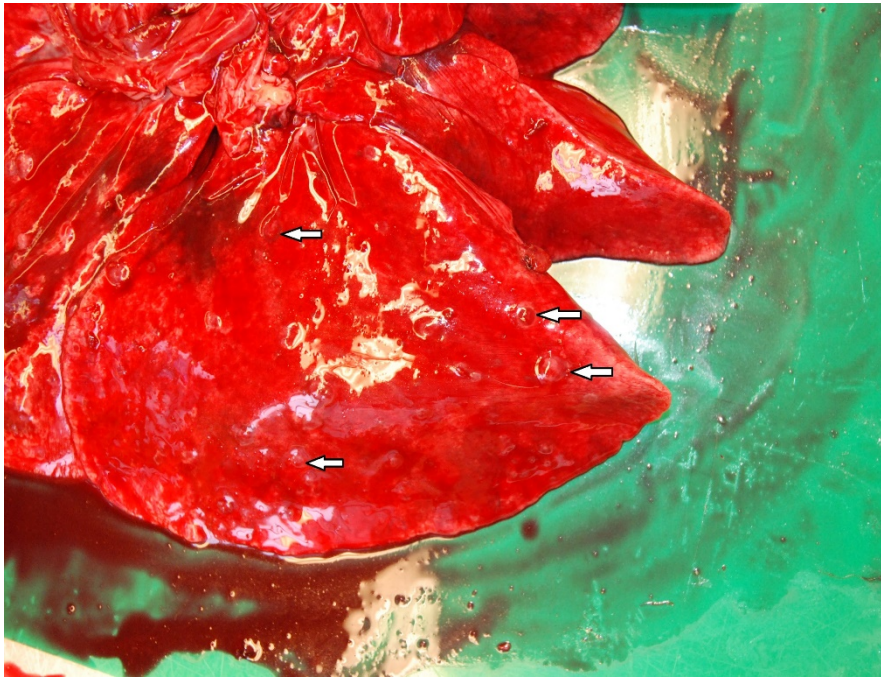
*a) Osteosarkom hos hund nr. 2 (13/28), som hadde osteosarkom distalt i venstre ulna. Svulsten ses som en stor og fast hevelse proximalt for carpalledet.*

*b) Snittflate av tumoren*

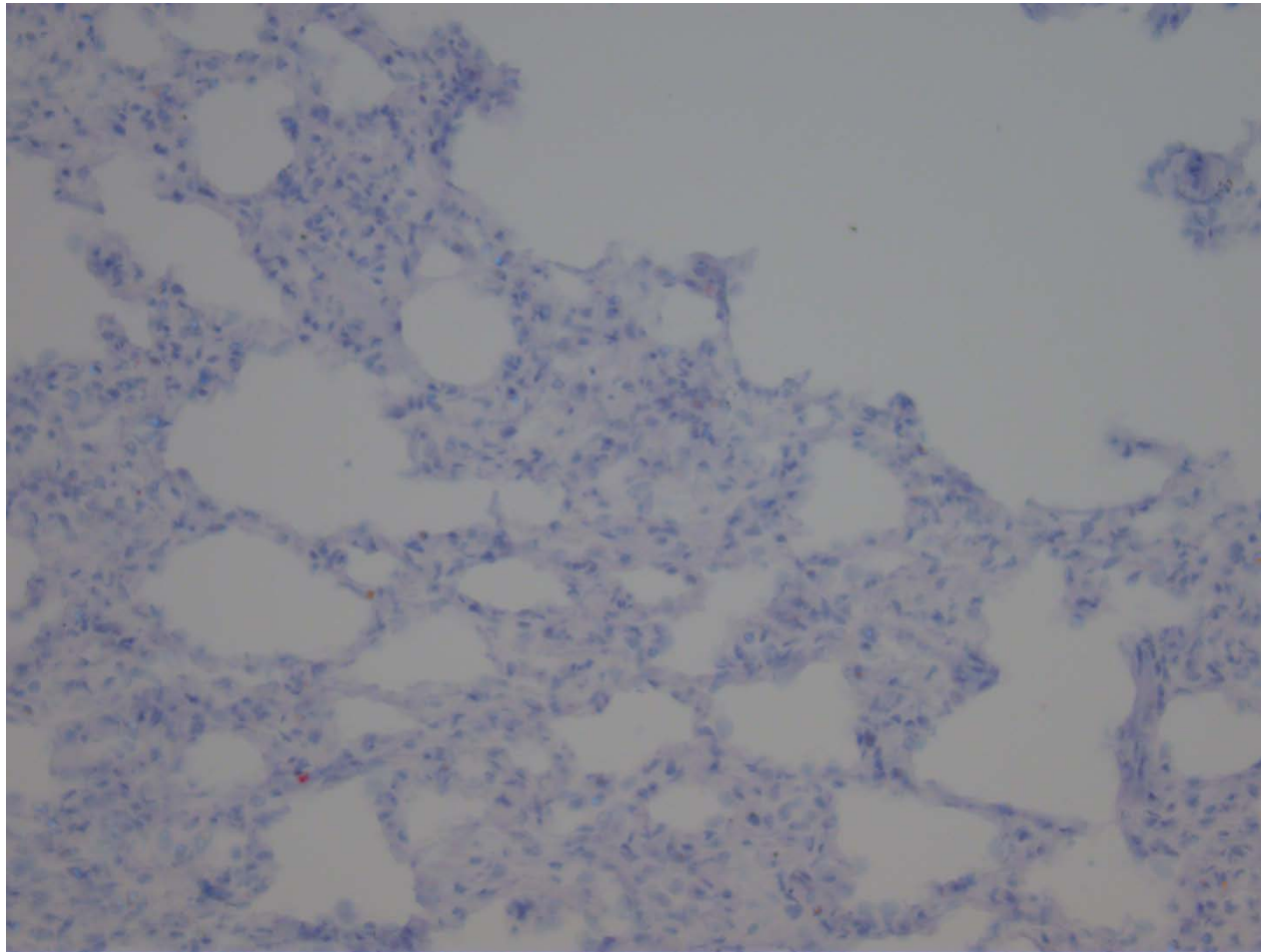


*Figur 4 - Hund nr. 2 (13/65), tvärsnitt av tumor i humerus.*



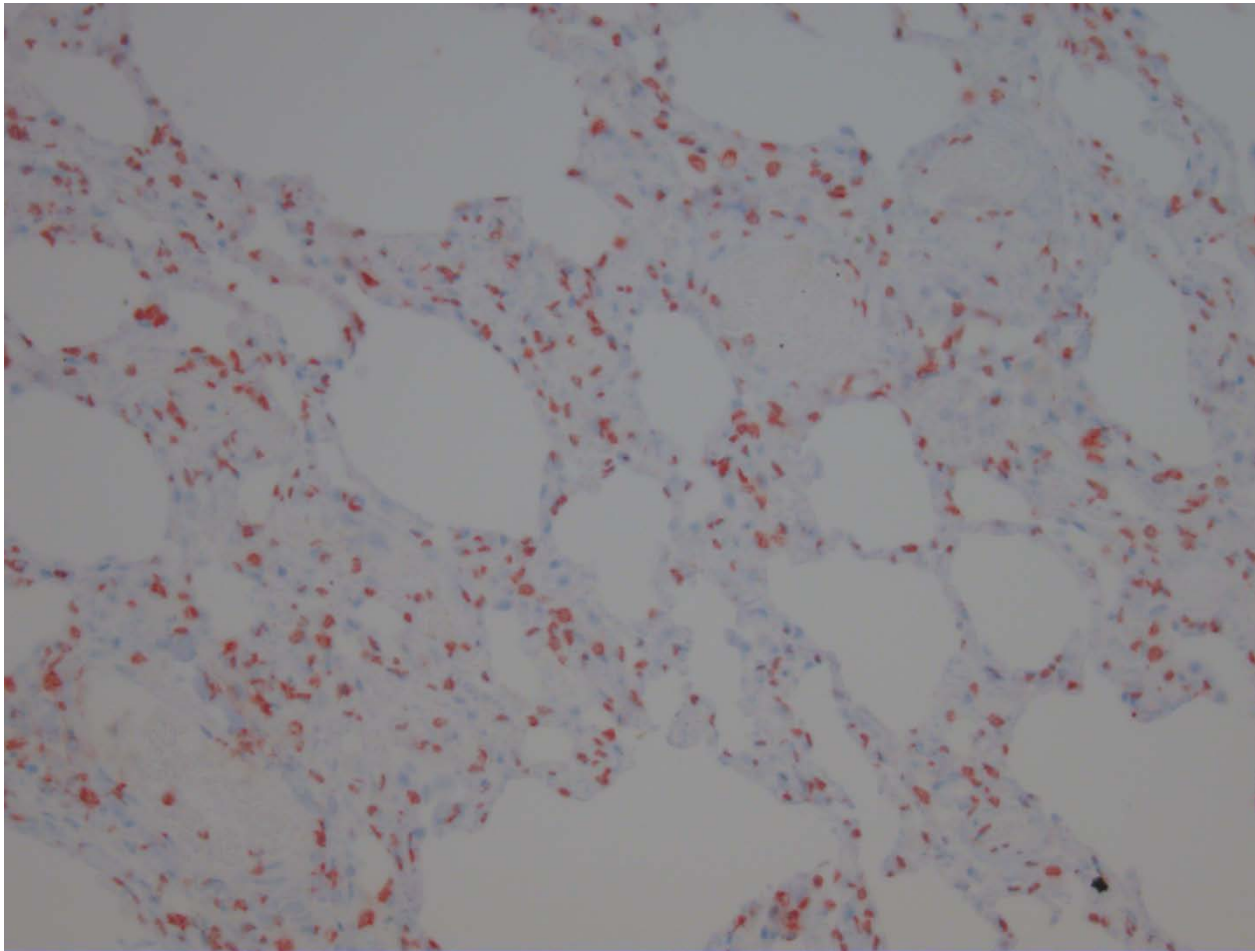


*Figur 5 a) og b) - Lunger fra hund nr. 1 med osteosarkom. Pilene peker på synlige metastaser i lungevevet, som hvelver seg lett over lungeoverflaten. En kunne palpere flere metastaser inne i vevet.*



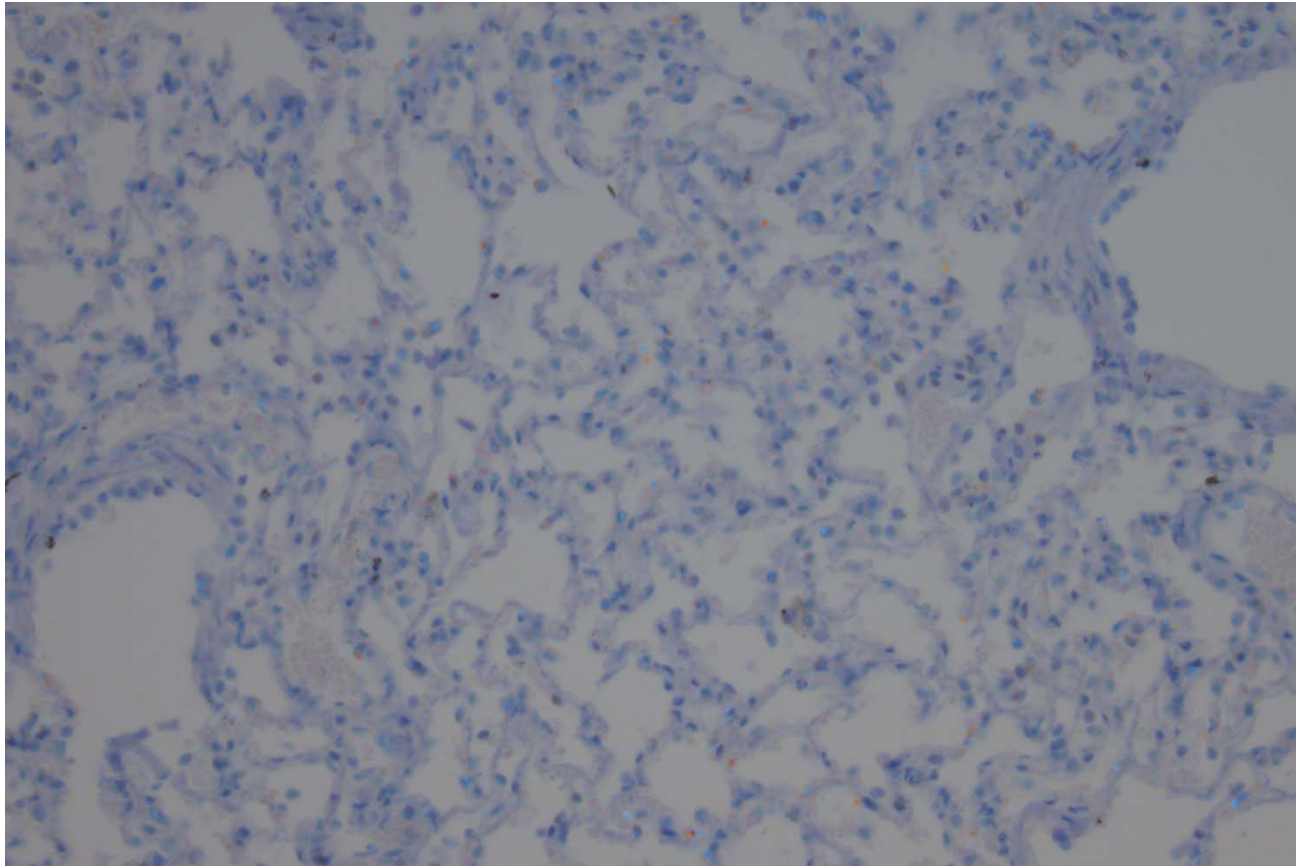
*Figur 8a Hund nr. 3 kontrollhund uten osteosarkom. Snitt 16/58 6 C,p TP-3 1:100*

*Bildet viser et utsnitt av lunge fra kontrollhunden uten osteosarkom. Det er negativt, med kun små artefakter som fargeutslag. I dette snittet var det ikke tegn til spesifikk farging av TP-3, og det ble gradert -1.*



*Figur 8b – Hund nr. 3 (kontrollhund). Snitt 16/58 2 Ep, TP-3 1:50 Dette bildet viser mange celler som har tatt spesifikk farge med TP-3 i kjernen. Det er også noen av cellene som har spesifikk farging av cytoplasma. Alveolesepta virker fortykkede, og det var noe overfarging og artefakter. Funnene på bildet var gjennomgående for hele snittet, som ble gradert 4+.*





*Figur 9 - Negativ kontroll, snitt fra hund nr. 113/28 I AC.*

*Dette bildet viser et snitt fra metastase-positiv hund som ble farget med immunhistokjemisk metode, men uten å tilsette primærantistoffet TP-3. Her var det ikke noe positivt utslag på TP-3, kun enkelte små fargerester. Snittet fikk graderingen 0, fullstendig negativ.*

## BRUKSANVISNING FOR IMMUNHISTOKJEMI MED TP3 antistoff

1 ampull inneholder ca. 1 mg/ ml (spar på denne i frosset tilstand – 20 grader)

Det vi skal bruke er en fortynnet løsning, og den skal fortynnes ganske mye

### IMMUNHISTO:

For immunhistokjemi bruker vi 10ug/ml (mikrogram per ml) i PBS m 10% FCS eller humant eller bovint føtalt albumin

+ azid eller antibiotika

Bruksløsningen kan stå i kjøleskap i månedsvis

### ROSETTINGSTEKNIKK MED TP3

Se bruksanvisning – annet sted.

Sjekk: Cancer Res 1988

1 mg = 1000 ug/ml





# Demaskering

---

## Trypsin

*Stamløsning av trypsin fortynnes 1:10 i 0.1 M Tris/HCl-buffer pH 8.0, og tilsatt 0.1 % CaCl<sub>2</sub>.*

Stamløsning av trypsin: (10 mg/ml Trypsin i Tris/HCl pH 8.0), finnes i fryser (-20°C) på toalettet.

Eksempel på trypsinløsning (50 ml):

Trypsin: 5 ml

0,1 M Tris/HCl buffer pH 8.0: 45 ml

CaCl<sub>2</sub> : 0,05 g (giftskap)

Kald løsning med snitt settes i varmeskap 37°C

## Citratbuffer i mikro

*200 ml citratbuffer pH 6.0 i grønn plastbeholder.*

Snittene settes i grønn plast beholder fylt med citrat- buffer. Snittene skal ha luft mellom hverandre, kan stå annenhver (blanke kan stå tette). Sett temperaturføleren i plastbeholderen, sett temperaturen til 92°C, når denne temperaturen er oppnådd sett klokken på 5 minutter. Døra på mikrobølgeovnen åpnes og snittene står i ytterligere 5 minutter. Citratbufferen helles av og snittene skylles raskt i destillert vann. Prosedyren gjøres om igjen, og siste trinn står snittene 15 min. Skylles raskt i destillert vann.

## Autoklavering.

Snittene settes i 0,01 M citratbuffer pH 6,0. Kjøres i 15 min ved 121°C.

Bruk av autoklav:

Sett snittene i hvite stripeglass (plass til 9 i ett glass), fyll nesten helt opp med buffer. Sett på lokk, skal ikke skrues helt igjen.

Kanne med vann i autoklaven må være mellom low og high. Hvis det er under low, fyll på med vann, hvis det er over high hell av vann. I bunn av autoklaven skal man kunne se væske speil før man kan starte. Hvis ikke hel på med vann til du ser vann i bunna av autoklaven. Stripeglassa settes i autoklaven, sett på lokket, og «sikkerhetsnøkkel». Ventil; exhaust må være stengt før autoklaven startes. Steng ventil, trykk på on knappen, og trykk start. Husk å påse at innstillingene er riktig. Innstillingene endres ved å holde time/temp inne og trykke på up/down knappene.

Åpne ventilen ved å vende på skruknappen. Slå av autoklaven etter bruk

*Skylles raskt i destillert vann*

# EnVision+ system, DAKO

---

## Prosedyre

### Deparafinering:

*Parafinen smeltes av snittene i varmeskap 58 °C i 30 minutter.*

Deparafineres i fargemaskinen på histolab. Bruk program nr 6: "deparaf u/varme"

### Demaskering:

Avhenger av antistoffet

### TBS/PBS:

*2 x 5 min på rist*

Kan velge om man vil bruke TBS eller PBS.

Bruk samme løsningen gjennom hele prosedyren.

### Inhibering:

*Snittene inhiberes i 10 min i 3 %  $H_2O_2$  i metanol*

$H_2O_2$  = 30% (står i kjøleskap på fiskelaben)

Metanol (står i giftskap på fiskelab)

#### Eksempel tillaging 50 ml:

(Stripeglass= 50 ml)

5 ml  $H_2O_2$ ,

45 ml metanol.

Helles over i stripeglass med snitta, ristes svakt for å få bort bobler. Står på ristemaskin med lokk på.

Står i 10 minutter.

Skyllles kort i destillert vann.

Løsningen kastes i avfallsbeholder med avfalls nr. 7042. Husk å bruke hansker ved håndtering av hydrogenperoksid.

**TBS/PBS:**

*2 x 5 min på rist*

Før blokkeringen ringer man rundt snitta med fettpenn (PAP penn).

Hele prosedyren kan kjøres på en dag, eventuelt kan snittene stå i PBS/TBS i kjøleskap over natten, og prosedyren kan fortsettes neste dag.

**Blokkering:**

*N-serum fra geit fortynnes 1:50 i 5 % BSA/TBS i 20 min*

Geit normalserum fortynnes (Står i kjøleskap immunlab)  
5 % BSA/TBS ligger i kjøleskap på fiskelaben

Fjern overflødig PBS/TBS fra snitta, dette kan gjøres ved å kakke snittglasset lett i bordet mot cellestoff, bruk en liten flik av cellestoff og la det suge opp overflødig væske uten å være nær snittet. Tilsett så 80-100 µl av blokkeringen. Tilsettes i fuktekammer. Ha på lokk og sett på rist i 20 minutter. Fuktekammer gjøres klar ved å klippe papir i strimler tilpasset kammerene, papiret fuktes og overflødig vann helles ut.

**Primær antistoff:**

*Primærantistoffet fortynnes i 1 % BSA/TBS. Inkuberes i 1 time i romtemperatur*

Husk: blokkeringen skal ikke skylles av før primærantistoffet tilsettes. Tørk av snittene med cellestoff, tilsett 80-100 µl av antistoffet. Antistoffet tilsettes positiv kontroll og prøvesnittene.

Blank og negativ kontroll tilsettes kun 1% BSA/TBS. Inkuberes i 1 time i fuktekammer på rist.

**TBS/PBS**

Skyll av primærantistoff med TBS/PBS skylleflaske, unngå å sprute rett på snittet. og sett i TBS/PBS i stripeglass på rist 2x 5 min.

**Sekundær antistoff**

*Sekundært antistoff fra kit (Labelled Polymer, HRP anti- mus eller anti- kanin) inkuberes i 30 min*

EnVision+anti-mus/kanin HRP. Ligger i kjøleskap fiskelab.

(Sekundært antistoff settes ut til romtemperering) Vend flasken før bruk.

Tørk av snittene og tilsett sekundært antistoff.

Drypp 1-2 dråper på snittet til det dekkes. Tilsettes i fuktekammer som settes på rist i 30 minutter

## **TBS/PBS**

Skyll av med TBS/PBS skylleflaske og sett i TBS/PBS på rist 2 x 5min.

### **Fremkalling:**

*AEC løsning fra kit.*

AEC finnes i samme eske som sekundærantistoffet.

Løsningen kan brukes like etter den er tatt ut av kjøleskapet. Løsningen kan bli ustabil ved oppbevaring utenfor kjøleskap over lengre tid. Settes inn i kjøleskapet like etter bruk.

Vend flasken før bruk.

Drypp 1-2 dråper på snittet til det dekkes.

Fremkalles i 5-20 minutter. Tiden avhenger av vevet og bør kontrolleres i mikroskop. Pass på at det ikke blir for sterk rødlig farge.

### **Kontrastfarging:**

Kontrastfarging kan gjøres i fargemaskinen. Snittene farges 20 sekunder i Mayers hematoxylin.

### **Blåning og stabilisering:**

Skylls i vann i ca. 5 minutter. Overføres til PBS/TBS.

### **Montering:**

Snittene monteres med PVA. Det står ett sett med glass og PVA løsning inne på immunlaben. **PVA står i kjemikalieskapet hvis det trengs påfyll.** Inneholder thimerosal som er giftig, bruk hansker ved montering.

## Medforfattererklæring (en pr student)

Som medforfattere for følgende fordypningsoppgave: Mikrometastaser i lunge ved osteosarkom hos hund: immunhistokjemisk påvisning med TP-3 et osteosarkom- spesifikt antistoff hos menneske

Skrevet av: Anne H Nornes og Sara M Solheim

Bekrefter vi at følgende student: Anne H Nornes

har bidratt i arbeidet med over nevnte fordypningsoppgave som angitt i tabellen under:

<b>Vancouver-kriterier*</b>		<b>Er dette kriteriet oppfylt for denne studenten? (Ja eller Nei)</b>	<b>Denne studentens bidrag i denne delen av oppgaven er (omtrentlig %andel)</b>
<b>1 (a, b eller c) og 2 (a eller b) og 3</b> må være oppfylt for å kvalifisere til forfatterskap for en vitenskapelig artikkel			
1a	Vesentlig bidrag til ide og planlegging av oppgaven	Ja	50%
1b	Vesentlig bidrag til å framskaffe de data oppgaven bygger på	Ja	50%
1c	Vesentlig bidrag i analyse og tolkning av data	Ja	50%
2a	Vesentlig bidrag i skriveprosessen	Ja	50%
2b	Kritisk evaluering av innholdet i oppgaven	Ja	50%
3	Gjennomlesing og godkjenning av den endelig versjon av oppgaven	Ja	50%

### Merknader:

<b>Dato, navn, signatur og mobiltelefon til alle forfatterne:</b>			
<b>Dato:</b>	<b>Navn:</b>	<b>Signatur:</b>	<b>Mob:</b>
6/5-16	Anne H Nornes		
	Sara M Solheim		

\*Medforfattererklæringen er laget med utgangspunkt i *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.icmje.org/index.html>)

## Medforfattererklæring (en pr student)

Som medforfattere for følgende fordypningsoppgave: Mikrometastaser i lunge ved osteosarkom hos hund: immunhistokjemisk påvisning med TP-3 et osteosarkom- spesifikt antistoff hos menneske

Skrevet av: Anne H Nornes og Sara M Solheim

Bekrefter vi at følgende student: Sara M Solheim

har bidratt i arbeidet med over nevnte fordypningsoppgave som angitt i tabellen under:

<b>Vancouver-kriterier*</b>		<b>Er dette kriteriet oppfylt for denne studenten? (Ja eller Nei)</b>	<b>Denne studentens bidrag i denne delen av oppgaven er (omtrentlig %andel)</b>
<b>1 (a, b eller c) og 2 (a eller b) og 3</b> må være oppfylt for å kvalifisere til forfatterskap for en vitenskapelig artikkel			
1a	Vesentlig bidrag til ide og planlegging av oppgaven	Ja	50%
1b	Vesentlig bidrag til å framskaffe de data oppgaven bygger på	Ja	50%
1c	Vesentlig bidrag i analyse og tolkning av data	Ja	50%
2a	Vesentlig bidrag i skriveprosessen	Ja	50%
2b	Kritisk evaluering av innholdet i oppgaven	Ja	50%
3	Gjennomlesing og godkjenning av den endelig versjon av oppgaven	Ja	50%

### Merknader:

### Dato, navn, signatur og mobiltelefon til alle forfatterne:

<b>Dato:</b>	<b>Navn:</b>	<b>Signatur:</b>	<b>Mob:</b>
6/5-16	Anne H Nornes		
	Sara M Solheim		

\*Medforfattererklæringen er laget med utgangspunkt i *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.icmje.org/index.html>)



