



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Lymfom hos hund - Serologiska biomarkörer

Joachim Erics

*Uppsala
2018*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2018:22

Lymfom hos hund

- Serologiska biomarkörer

Canine lymphoma

- Serological biomarkers

Joachim Erics

Handledare: *Magnus Åbrink och Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Examinator: *Maria Löfgren, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2018:22

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: biomarkörer serum lymfom hund

Key words: biomarkers serum lymphoma dog canine

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<input type="checkbox"/>	SAMMANFATTNING	1
<input type="checkbox"/>	SUMMARY	2
<input type="checkbox"/>	INLEDNING	3
<input type="checkbox"/>	MATERIAL OCH METODER	4
<input type="checkbox"/>	LITTERATURÖVERSIKT	4
	Vad är lymfom	4
	Hur diagnostiseras lymfom	4
	Vad är biomarkörer	5
	Vilka biomarkörer i serum kan användas vid lymfom	5
	Thymidine kinas-1	5
	C-reaktivt protein	6
	Haptoglobin	7
	Cytokiner	8
	Biomarkörer för lymfom hos människor	8
<input type="checkbox"/>	DISKUSSION	10
<input type="checkbox"/>	LITTERATURFÖRTECKNING	12

SAMMANFATTNING

Lymfom är en av vanligaste maligna neoplasierna hos hund och en av de som behandlas mest. För att ställa en definitiv diagnos på lymfom bör cytologi och/eller histologi göras. I både human- och veterinärmedicin finns ett stort intresse för att hitta en biomarkör i blod för diagnos, prognos och övervakning vid behandling av lymfom. Intresset har resulterat i många studier av potentiella biomarkörer. I denna litteraturstudie har frågeställningen varit vilka möjliga biomarkörer som finns i serum vid diagnostik. Litteraturstudien diskuterar om biomarkörer kan användas för att säkerställa prognos samt övervaka behandling vid lymfom hos hund.

Det har länge varit av kliniskt intresse att finna biomarkörer för lymfom hos hund. Det finns få biomarkörer för lymfom i serum som har resulterat i kommersiella tillgängliga tester. Thymidine kinas-1 (TK-1), C-reaktivt protein (CRP) och haptoglobin är de som hittills har lanserats som kommersiella tester. I denna litteraturstudie beskrivs vad som har publicerats om TK-1, CRP, haptoglobin och cytokiner med avseende på biomarkör i serum för lymfom hos hund.

Det finns många likheter mellan lymfom hos hund och lymfom hos människa, både likheter i miljön och i molekylära abnormaliteter. Inom humanmedicin har ett liknande intresse funnits för att hitta biomarkörer i blod för lymfom. TK-1, CRP, haptoglobin och cytokiner har även testats inom humanmedicin som biomarkörer för lymfom. Laktatdehydrogenas (LDH) är ett exempel på en biomarkör som används mest inom humanmedicin för att diagnosticera och ställa prognos vid lymfom. LDH har även testats för hundar men resultaten överlappade mellan friska hundar och sjuka hundar.

Många av biomarkörerna i serum kan återfinnas vid andra tillstånd än lymfom, speciellt vid andra typer av maligna neoplasier. Specificiteten och sensitiviteten varierar med olika biomarkörer och studier. Vid användning av biomarkörer är det viktigt att veta vad testets styrkor är och i vilka sammanhang det är lämpligt att använda markören. Även om en biomarkör inte kan användas ensam för att ställa en diagnos, kan den vara användbar för att övervaka effekt av behandling eller utesluta att en malign neoplasi föreligger.

Tack vare att intresset för biomarkörer vid lymfom hos hund finns och att flertalet studier görs på olika biomarkörer, kan det förhoppningsvis i framtiden underlätta det kliniska arbetet. Även om det krävs fler studier för att avgöra hur känsliga olika biomarkörer är och i vilka sammanhang de är användbara, visar flera biomarkörer stor potential att fungera som ett redskap för att diagnosticera, ställa prognos och övervaka behandling av lymfom hos hund.

SUMMARY

Lymphoma is one of the most commonly diagnosed and treated malignant neoplasia in the dog. A definitive diagnosis of canine lymphoma should include histology or/and cytology. An interest in finding a biomarker in blood to diagnose, make prognosis or overview relapse at treatment of lymphoma in both human- and veterinary practice has resulted in many studies of potential biomarkers. Focus in this study has been to find out potential serological biomarkers that can be used to diagnose, prognose and overview treatment effects at lymphoma in the dog.

Finding a biomarker for canine lymphoma has long been of clinical interest and many studies have been performed in attempts to find one. There are few serological biomarkers that have resulted in commercial tests for lymphoma but TK-1, CRP and haptoglobin have been used to provide commercial lymphoma tests for dogs. This literature study describes published research on the applicability of TK-1, CRP, haptoglobin and several cytokines as biomarkers for lymphoma in dogs.

There are many similarities between human and canine lymphoma, including both environmental and molecular abnormalities. In human medicine, there is also an interest in finding a specific biomarker for lymphoma. Tested biomarkers for lymphoma in human medicine include TK-1, CRP, haptoglobin and cytokines although LDH is the most used biomarker in serum during human lymphoma. LDH has been tested as a biomarker in dogs with lymphoma but with overlapping results between healthy and diseased dogs.

Many of the biomarkers found in serum during lymphoma can also be found during other diseases, especially during other malign neoplasia. Specificity and sensitivity varies between different biomarkers and studies. When using biomarkers it's important to understand the strength of the test and during which scenarios it's effective. Even though a biomarker might not be able to diagnose a specific disease, it might be useful to follow up treatment or to exclude the presence of malign neoplasia.

There is an interest in finding a biomarker for lymphoma and many have been studied. In the future there will hopefully be more tools to use at the clinic to diagnose, make prognosis and follow up treatment of lymphoma. Further studies are required to determine the sensitivity of biomarkers and in which scenario they might be useful.

INLEDNING

Lymfom hos hund är en av de vanligaste diagnoserna vid maligna neoplasier och en av de cancerformer som behandlas mest. Förekomsten av lymfom hos hund har ökat och samma trend har setts med non-Hodgkin lymfom hos människa. En anledning som har föreslagits är att det finns liknande riskfaktorer hos människa och hund (Zandvliet, 2016).

Lymfom motsvarar mellan 7 och 24 % av alla neoplasier hos hund (Withrow & MacEwen, 2013). Hundar i alla åldrar kan drabbas, men det är vanligast hos hundar mellan 6-9 år. Raser där lymfom förekommer oftare är boxer, mastiff, basset hound, sankt bernhardshund, skotsk terrier, airedaleterrier och bulldogg (Withrow & MacEwen, 2013). Det finns ingen uppenbar predisponering beroende på kön, men tikar som inte har kastrerats verkar ha en mindre risk att få lymfom medan tidig kastration av golden retriever hanar har föreslagits öka risken för lymfom (Zandvliet, 2016).

Prognosen vid lymfom varierar beroende på typ av neoplastisk lymfocyt, lokalisation, karaktär av cellerna och i vilket skede sjukdomen är (Burkhard & Bienzele, 2013). Endast en liten andel av hundarna som diagnosticeras med lymfom blir botade, men majoriteten kan få en förlängd livslängd med hjälp av kemoterapi (Zandvliet, 2016). En studie som undersökte livslängden hos hundar med lymfom visade att medianlivslängden var 218 dagar efter diagnos och att livslängden varierade beroende på vilken typ av lymfom hundarna hade. I studien ingick 451 hundar och höggradigt T-cellslymfom var den form av lymfom där livslängden var kortast (Valli *et al.*, 2013).

Cancerdiagnos hos både människor och hundar kompliceras av bristen på icke-invasiva diagnostiska tester (Johnston *et al.*, 2014). Potentiellt skulle biomarkörer kunna användas för detta ändamål (Henry, 2010). Biomarkör definieras som ett biologiskt ämne i blod, andra kroppsvätskor eller vävnader som kan tyda på normal eller abnormal process, ett tillstånd eller en sjukdom (Henry, 2010). Det har länge varit av kliniskt intresse att hitta biomarkörer i serum för att påvisa lymfom, ställa prognos och övervaka behandlingseffekt. Många olika molekyler har undersöks som potentiella biomarkörer vid lymfom, men få har resulterat i kommersiellt tillgängliga tester (Bryan, 2016).

När diagnostiska tester utvärderas används ofta begreppen sensitivitet och specificitet. Sensitivitet är ett mått på hur stor andel av djur med en sjukdom som kommer få positivt resultat för sjukdomen. Exempelvis om sensitiviteten för ett test är 83 % betyder det att av djuren med sjukdom kommer 83% testa positivt och 17 % negativt. Specificitet är ett mått på hur stor andel av friska djur som kommer få negativt resultat för sjukdomen. Exempelvis om specificiteten är 75% betyder det att av friska djur kommer 75 % testa negativt och 25 % positivt. Sensitivitet används för att utesluta sjukdom och specificitet används för att säkerhetsställa sjukdom (Drobatz, 2009).

Denna litteraturstudie tar upp några av de biomarkörer i serum som har undersökts för diagnos, prognos och övervakning av behandling av lymfom hos hund.

MATERIAL OCH METODER

Databaser som används i litteraturstudien är Web of Science, PubMed och SLUs biblioteks söktjänst primo. Sökord som använts är biomarker* lymphoma dog* OR canine*, TK-1 lymphoma dog* OR canine*, CRP lymphoma dog* OR canine*, haptoglobin lymphoma dog* OR canine*, cytokine* lymphoma dog* OR canine*, biomarker* lymphoma serum*, diagnostics lymphoma dog* OR canine* och sensitivity and specificity veterinary.

Sökningarna avgränsades till de senaste 5 åren och vid brist av studier så förlängdes tidsintervallet ytterligare. I början av litteraturstudien lästes artiklar för att få en översikt om vilka biomarkörer som var aktuella för lymfom hos hund, senare avgränsades sökningarna till biomarkörer i serum. Boken *Small Animal Clinical Oncology* femte upplagan har använts för att få grundläggande information om lymfom hos hund.

LITTERATURÖVERSIKT

Vad är lymfom

Lymfom är en heterogen grupp av neoplasier som härstammar från celler i lymfsystemet. Lymfom uppkommer ofta i lymfoid vävnad, men kan uppkomma i nästan alla vävnader i kroppen. Majoriteten av fall med lymfom utgår från B-cellerna (cirka 70%) och en mindre andel från T-cellerna (cirka 30%), men stora skillnader finns mellan olika hundraser (Withrow & MacEwen, 2013).

Det finns olika former av lymfom där den vanligaste formen på kliniken är multicentrisk lymfom där de perifera lymfknutorna har drabbats. Andra extranodulära former av lymfom är mediastinal, abdominal, gastrointestinal, lever, mjälte, njure, kutan, okulär, CNS och lungor. Att det finns många olika former av lymfom medför att symtomen kan vara varierande och de kliniska symtomen kan variera ytterligare av paraneoplastiska symtom (Zandvliet, 2016).

Etiologin bakom lymfom är troligtvis multifaktoriell och fortfarande till stor del okänd (Withrow & MacEwen, 2013). Miljöfaktorer, virus och ett icke-fungerande immunförsvar har föreslagits som anledningar till uppkomst av lymfom (Zandvliet, 2016).

Hur diagnostiseras lymfom

Lymfom hos hund är en heterogen grupp av sjukdomar som beter sig olika beroende på histologisk typ och om det har spridit sig systemiskt. Metoder för att diagnosticera lymfom i början av och efter behandling kan skilja sig mellan länder och institutioner (Marconato *et al.*, 2017).

Behandling och prognos av lymfom är väldigt beroende av vilken typ av lymfom och hur långt gången canceren är. Exempelvis kan patienter med vissa typer av lymfom svara bättre på en kort behandling med kemoterapi istället för en fullständig behandling, varför det är väldigt viktigt med en korrekt diagnos (Kong *et al.*, 2013).

Diagnos av hundar med misstänkt lymfom bör innehålla fysisk undersökning, blodstatus, differentialräkning, trombocytantal, biokemisk profil på serum och urinalys. För en definitiv diagnos bör vävnadsprov eller cytologi tas (Withrow & MacEwen, 2013). Typiskt för lymfom är att diagnosen är beroende av morfologi vid cytologi och/eller histopatologi. Under senare år har ytterligare metoder tillkommit för att ställa diagnos och prognos. Metoder som kan användas är immunocytokemi (ICC), immunohistokemi (IHC), immunofenotypning med flödescytometri och PCR för att upptäcka clonal antigen receptor gene rearrangement. Ofta används en kombination av dessa för att öka specificiteten och sensitiviteten (Burkhard & Bienzle, 2013)

Vad är biomarkörer

Biomarkörer är enligt national cancer institute (NCI) ”en biologisk molekyl i blod, andra kroppsvätskor eller vävnader som tyder på normal eller abnormal process, ett tillstånd eller en sjukdom”. Biomarkörer kan påvisas i serum, urin, vävnad, cerebrospinalvätska och utandningsluft. Biomarkörer skulle potentiellt kunna användas hos cancerpatienter för att ställa diagnos, kategorisera, bedöma prognos och övervaka behandlingens effekt (Henry, 2010).

Vilka biomarkörer i serum kan användas vid lymfom

Många biomarkörer har testats för att påvisa lymfom, men få har resulterat i kommersiellt tillgängliga test. De biomarkörer som används inom kommersiella test är thymidine kinas-1 (TK-1), C-reaktivt protein (CRP) och haptoglobin. Många av biomarkörerna har testats för diagnos och prognos vid lymfom, men få har testats för att övervaka behandlingseffekter (Bryan, 2016).

Andra biomarkörer som undersökts vid lymfom är alpha-fetoprotein (AFP), microRNA, kortikosteroid inducerade alkaliskt fosfatas (ALP), laktatdehydrogenas (LDH), high-mobility grupp B1 proteiner (HMGB1), serum amyloid A (SAA) samt profilering av metaboliter i serum med gaskromatografi (Bryan, 2016).

Inom humanmedicin har cytokiner kopplats samman med utvecklande av lymfom och varit användbara biomarkörer för att se hur patienten svarar på behandling samt för att ställa prognos (Calvalido *et al.*, 2016). I denna litteraturstudie har fokus varit att undersöka användandet av TK-1, CRP, haptoglobiner och cytokiner som biomarkörer för lymfom hos hund.

Thymidine kinas-1

TK-1 är ett cellcykelberoende enzym som kan användas som biomarkör för cellproliferation (Grobman *et al.*, 2017). TK-1 är specifikt för S-fasen i cellcykeln och uttrycks mest vid övergång från G1 till S-fas. TK-1 minskar snabbt i G2 och går ej att detektera i M-fas (Jagarlamudi *et al.*, 2014). Ökning av TK-1 aktivitet extracellulärt kan betyda ökande DNA-syntes och ökande antal celler som dör under S-fas, vilket leder till ökad frisättning av TK-1 till blodet (Elliott *et al.*, 2013).

Intresset för TK-1 som markör för tumörer började redan på 1970-talet och berodde på att man observerade ökad koncentration av TK-1 i serum vid oreglerad cellproliferation. Vid proliferation av cancerceller och en oreglerad cellcykel ökar TK1 aktiviteten och frisätts i blodet. Nivåerna av aktivt TK-1 följer graden av tumör och behandling, om tumören fortsätter utvecklas ökar aktiviteten av TK-1 och TK-1 aktiviteten kan minska vid lyckad behandling (Selting *et al.*, 2016). Andra situationer när TK-1 aktiviteten kan öka i serum är premaligna situationer, virusinfektioner och inflammatoriska situationer (Schleis, 2014).

Hos hundar med lymfom ökar TK-1 aktivitet i plasma och serum. Högre aktivitet av TK-1 följer vid högre klassificeringen av sjukdom och vid sämre prognos. Vid mätning av TK-1 aktivitet påvisas endast intakta funktionella enzymer, vilket kan vara relevant vid vissa typer av cancer. Koncentrationen av TK-1 i serum går att mäta på fragment av TK-1, vilket kan vara mer relevant vid solida tumörer. Att mäta fragment av TK-1 kan även minska variation i resultat till följd av provhantering som kan påverka enzymaktiviteten (Selting *et al.*, 2016). TK-1 aktivitet mäts med radioisotoper, vilket kan begränsa den kliniska användbarheten då radioisotoper är skadliga och dyra. Att istället mäta nivåer av TK-1 protein med ELISA skulle kunna öka tillgängligheten på klinikerna (Jagarlamudi *et al.*, 2015).

I en studie med 98 hundar varav 34 var friska, 29 med lymfom, 2 med leukemi och 35 med solida tumörer testades TK-1 aktivitet. Resultatet visade att 94 % av hundarna med hematologiska tumörer hade ökad TK-1 aktivitet och att TK-1 aktiviteten skilde sig mycket mellan hundar med lymfom jämfört med friska hundar. Det var en stor variation av TK-1 aktivitet inom gruppen med lymfom vilket författarna tror beror på att gruppen innehöll olika typer av lymfom (Sharif *et al.*, 2012).

I en senare studie har en TK1-ELISA använts för att mäta nivåer av TK1 protein i samband med hematologiska tumörer. Resultatet blev 97% specificitet och 78% sensitivitet. I samma studie mättes även TK-1 aktiviteten med resultat 97 % specificitet och 70 % sensitivitet (Jagarlamudi *et al.*, 2015).

En annan studie som mätt TK-1 aktivitet hos 73 hundar innan behandling för lymfom hade endast 47 % TK-1 aktivitet över referensvärdet. En problematik med studien var dock att det var få hundar där TK-1 aktivitet mättes upprepande gånger under behandlingen. Författarna till studien menar att ytterligare studier bör göras på TK-1 aktivitet, speciellt på hundar som hamnar inom referensvärdena vid diagnos (Elliott *et al.*, 2013).

C-reaktivt protein

CRP är ett akutfasprotein med pentamer struktur. CRP binder bland annat till fosfokolin, en lipid som bildar cellvägg i bakterier och andra patogener. Bindningen till fosfokolin aktiverar komplementsystemet (Jasensky *et al.*, 2014).

CRP produceras i levern och induceras av interleukin-1 (IL-1)(Schleis, 2014). Interleukin-6 (IL-6) och tumor necrosis factor (TNF) har också visats stimulera syntes av CRP (Shrotriya *et al.*, 2015). I serum ökar CRP snabbt inom fyra timmar efter inflammatoriskt stimuli och återgår snabbt tillbaka till normala nivåer (Schleis, 2014). CRP har en

halveringstid på 19 timmar och är en mer stabil markör för inflammation än proinflammatoriska cytokiner som ofta har kort halveringstid på minuter (Shrotriya *et al.*, 2015)

Inflammation är essentiellt för olika steg av cancerutveckling. CRP kan indikera systemisk inflammation och TK-1 aktivitet kan indikera proliferation av cancerceller. Kombination av dessa markörer kan användas för att påvisa cancer. I en studie där CRP och TK-1 aktivitet kombinerades kunde en mängd olika maligna cancerformer upptäckas 6 månader innan symtom uppkom med en sensitivitet på 82 % och en specificitet på 91 %. I samma studie kunde de falska positiva resultaten minska från 30 % till 9 % genom att använda både CRP och TK-1 aktivitet istället för bara TK-1 aktivitet (Selting *et al.*, 2015).

Veterinary Diagnostics Institute (VDI) har skapat ett test för att kombinera TK-1 aktiviteten och CRP. Testet heter VDI-TKcanine+ och marknadsförs som ett test för hundar med misstänkt eller bekräftad cancer. VDI listar en kohortstudie på sin hemsida med 390 hundar varav 52 hade cancer. I studien hade testet 96 % sensitivitet och 85% specificitet. Men artikeln är inte publicerad i någon peer reviewed tidskrift och det anges inte vilka varianter av cancer det rörde sig om (Schleis, 2014).

Haptoglobin

Haptoglobin är ett akutfasprotein som produceras i levern. Haptoglobin binder till cirkulerande eller fritt hemoglobin i blodet och transporterar det tillbaka till levern. Inducering sker av IL-6 och högre nivåer av haptoglobin ses senare i inflammationssvaret (Schleis, 2014). Fritt hemoglobin är väldigt toxiskt och kan orsaka oxidativa vävnadsskador genom att frisätta järn. Genom att haptoglobin binder hemoglobin minskar skadorna och det sker även mindre förlust av hemoglobin och järn (Costacou & Levy, 2012).

Med hjälp av två kohortstudier har CRP och haptoglobin utvärderats som biomarkörer för att påvisa lymfom. Genom att bara ta hänsyn till koncentrationer av CRP och haptoglobin utan att känna till kliniska symtom erhöles en sensitivitet på 69% och en specificitet på 83,5 %. När kliniska symtom som lymfkörtelförstoring tillsammans med biomarkörerna lades till erhöles högre sensitivitet och specificitet i kohortstudien (Mirkes *et al.*, 2014).

Ett test för att diagnosticera och övervaka återgång av lymfom hos hund har lanserats av Petscreen Ltd och Avacta Animal Health. Testet heter canine lymphoma blood test (cLBT) och mäter CRP och haptoglobin i serum. Resultaten av akutfasproteinerna beräknas sedan med en algoritm och svar erhålls i en skala 0-5. Vid övervakning av tillbakagång av sjukdom motsvarar 0 fullständig återhämtning medan 5 motsvarar aktiv sjukdom. Vid diagnos motsvarar 0-2 negativt resultat, 2-3 är tvetydligt och 3-5 är positivt för lymfom. I en studie innehållande 30 hundar med lymfom erhöles testet 92% sensitivitet och 80% specificitet för att upptäcka lymfom och övervaka tillbakagång av sjukdom (Schleis, 2014).

I en annan studie följdes 57 hundar med lymfom under och efter behandling. Serum från hundarna testades med cLBT och jämfördes med resultat från klinisk undersökning samt

cytologi. Resultatet från jämförelsen blev att cLBT stämde överens med 93,5 % sensitivitet och 74,2 % specificitet (Alexandrakis *et al.*, 2017).

Cytokiner

Celler från immunsystemet kommunicerar med varandra genom produktion av lösliga faktorer s.k. cytokiner. Cytokiner möjliggör direkt kommunikation mellan immunceller och att andra celler kan signalera till immunsystemet vid te x infektion eller vid vävnadsskada. Cytokiner är även viktiga vid hematopoesen och differentiering av immunceller (Hunter & Ziegler, 2015).

Interleukin-6 (IL-6) är en cytokin som medverkar i den tidiga akutfasreaktionen och produceras då främst av monocyter och makrofager. I kroniska inflammationer produceras istället IL-6 främst av T-celler. Frisättning av IL-6 stimuleras av lipopolysackarider, virusinfektioner och produkter från nekrotiska celler. IL-6 inducerar produktion av akutfasproteinerna SAA och CRP (Schüttler & Neumann, 2015).

Interleukin-10 (IL-10) är en cytokin med anti-inflammatoriska egenskaper som produceras av flera olika typer av celler t.ex. monocyter, makrofager och T-celler. IL-10 binder till receptorer på cellytan vilket leder till intracellulär signalering och transkription av olika gener. När IL-10 binder till monocyter minskar uttrycket av adhesionsmolekyler och frisättning av proinflammatoriska mediatorer medan det sker ökad frisättning av anti-inflammatoriska mediatorer (Ogasawara & Stokol, 2012).

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) är en kemokin som uttrycks av flera olika celler som svar på inflammation. MCP-1 har kemotaxisk funktion genom att binda till receptorer på makrofager och monocyter. Flera studier har visat att MCP-1 har en viktig roll vid kronisk inflammation och att MCP-1 kan produceras av flertalet maligna celler hos människa (Ishioka *et al.*, 2013).

I en studie på hundar visades signifikant förhöjda halter av IL-6, IL-10 och MCP-1 i serum hos hundar med lymfom jämfört med friska hundar. Vidare visades nivåerna av IL-10 och MCP-1 vara högre i hundar med B-cells lymfom medan IL-6 och MCP-1 var högre i hundar med T-cells lymfom (Calvalido *et al.*, 2016).

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) är en proinflammatorisk cytokin som visats uttryckas mer i serum hos människor med non-Hodgkins lymfom. I en studie mättes TNF- α i serum hos 50 hundar, 25 av hundarna hade diagnostiserats med lymfom och 25 var friska kontroller. Resultatet blev att 3 av 25 hundar med lymfom hade upptäckbara halter av TNF- α medan det i kontrollgruppen inte fanns detekterbara halter TNF- α (Hofer *et al.*, 2011).

Biomarkörer för lymfom hos människor

Lymfom hos hund liknar lymfom hos människor på många vis, likheter finns bland annat mellan molekylära avvikelser och att liknande svar erhålls vid kemoterapi (Richards & Suter, 2015). Vid diagnos av lymfom på humansidan är biopsi av lymfkörtlarna golden standard. Enkelheten att erhålla ett blodprov gör att biomarkörer i blod är av intresse även

på humansidan. Biomarkörer i blod som kan användas för att ställa en exakt diagnos för maligna förstörade lymfkörtlar saknas dock fortfarande (Ma *et al.*, 2017). TK-1, CRP, haptoglobin och cytokiner är några av de biomarkörer som testats för lymfom även hos människa (Epelbaum *et al.*, 1998; Yildirim *et al.*, 2009; Gatt *et al.*, 2015; Binder *et al.*, 2017).

LDH är ett glykolytiskt enzym som omvandlar laktat till pyruvat och ett exempel på en biomarkör som används mest inom humanmedicin vid diagnos och prognos av lymfom. LDH har dock begränsad specificitet då ökade nivåer av LDH i serum har upptäckts vid andra icke-neoplastiska sjukdomar som t.ex. skador på myokardiet (Hammouda *et al.*, 2017). LDH har även testats som biomarkör hos hundar och i en studie med 527 hundar, varav 128 friska, 211 med icke-neoplastiska sjukdomar och 188 med cancer, blev resultatet att cirka 50 % av hundar med maligna tumörer, 23,2 % av hundar med icke-neoplastiska sjukdomar och 6,2 % av friska hundar hade ökade nivåer LDH. LDH var högre i 78,2 % av hundarna med lymfom. Författarna drog slutsatsen att LDH inte är användbart för att avgöra om det är tidigt eller sent stadie av lymfom, men att LDH eventuellt skulle kunna användas för att ställa en säkrare diagnos vid förstörade lymfknutor för att utesluta andra orsaker som t.ex. leishmanios hos hund (Marconato *et al.*, 2009).

DISKUSSION

Lymfom är en av de vanligaste maligna neoplasier hos hund och en av cancerformerna som behandlas mest. Lymfom är en heterogen grupp av sjukdomar som kan uppkomma i nästan alla organ i kroppen och symtomen kan försvåras av neoplastiska symtom. Cytologi och/eller histologi är de metoder som används i dag för att bekräfta lymfom hos både människor och hundar (Zandvliet, 2016).

För att undvika mängden invasiva tester som biopsi och finnålsaspiration skulle det vara en fördel att hitta biomarkörer i serum (Johnston *et al.*, 2014). Dessutom skulle biomarkörer i serum kunna användas innan symtom uppstår, för att kunna inleda eventuell behandling eller gå vidare med ytterligare undersökningar. Biomarkörer skulle även kunna användas för att övervaka verkningsgrad av behandlingen och kunna ändra behandlingen vid utebliven effekt.

Det finns många biomarkörer som testats för att påvisa lymfom, men få har resulterat i kommersiellt tillgängliga tester. CRP, haptoglobin och TK-1 finns tillgängliga som kommersiella tester idag (Bryan, 2016). Det finns fördelar och nackdelar med de flesta biomarkörer som testats. Det är viktigt att förstå ett tests styrkor och svagheter och i vilka sammanhang det bör användas. Vissa test kan vara användbara för att övervaka hur en behandling fungerar, medan de inte fungerar alls för att påvisa en specifik sjukdom. Det är då viktigt att förstå när ett test är användbart eller inte (Henry, 2010). Även om en biomarkör inte fungerar som ensamt redskap för diagnos, kan markören i kombination med andra diagnostiska metoder tänkas öka sensitiviteten och specificiteten.

Biomarkörer som testas för lymfom har olika sensitivitet och specificitet. Ett test ska gärna ha både hög sensitivitet och specificitet, men det är intressant att fundera på vilket som är att föredra. Om en biomarkör föredras med hög sensitivitet vilket fångar upp merparten sjuka hundar, med risk att den även får med friska hundar som testar falskt positivt för lymfom. Eller om det istället föredras en biomarkör med hög specificitet som fångar upp merparten friska hundar, med risk att den även får med sjuka hundar som testar falskt negativt för lymfom. Frågan är om det är viktigast att fånga upp alla sjuka hundar eller om det är viktigare att kunna med stor säkerhet kunna friskförklara hundar från lymfom. Även om det är viktigt att fånga upp alla sjuka hundar med en hög sensitivitet, kan ett test med för låg specificitet innebära risk för friska hundar som testar falskt positivt. Då biopsi och cytologi kräver kunnig personal och troligtvis narkos, kan vidare utredningar vara kostsamma samt vara riskabla för hundarna.

Både CRP och haptoglobin är akutfasproteiner som bör återfinnas i stigande koncentrationer vid flertalet olika sjukdomar. Däremot kan akutfasproteiner ge en indikation på att något är fel och att ytterligare undersökningar bör göras, samt att de kan vara en indikator på att en behandling av lymfom inte ger önskad effekt. Det kan även finnas möjlighet att kombinera akutfasproteiner med andra tester för att öka känsligheten i testerna.

TK-1 verkar lovande med dess egenskaper att stiga i koncentration i serum vid ökad cellsyntes och ökad celldöd, vilket är troligt vid maligna neoplasier. Möjliggörandet av att

mäta proteinhalten och inte endast aktiviteten av TK-1 skulle kunna medföra mer tillgängliga tester för klinikerna (Jagarlamudi *et al.*, 2015).

Cytokiner används av immunceller för kommunikation med varandra och omgivningen. Då lymfom utgår från immunceller, är det rimligt att anta att lymfom kan medföra förändrade nivåer av cytokiner i blodet. Att cytokiner varit användbara inom humanmedicin i samband med lymfom gör det värt att studera eventuella samband även hos hund. I linje med detta resonemang visade en studie förhöjda halter av IL-6, IL-10 och MCP-1/CCL2 vid lymfom hos hund. I studien förekom även skillnader i cytokinkoncentrationer mellan lymfom utgående från B-celler och T-celler, vilket i framtiden möjligen skulle kunna användas i samband med diagnos (Calvalido *et al.*, 2016).

Något som kännetecknar de flesta biomarkörer i serum är att de ökar i koncentrationer vid många olika typer av maligna neoplasier. Det medför att det är svårt att undvika att vara beroende av invasiva metoder som cytologi och histologi för att ställa slutgiltig diagnos. I det avseendet kan biomarkörer i serum vara mer användbara för att övervaka behandling efter fastställd diagnos eller ytterligare stärka misstanke om att det rör sig om neoplastisk sjukdom och inte någon annan differentialdiagnos.

Både hos hund och människa finns det ett intresse av att hitta användbara biomarkörer för att diagnosticera, kategorisera, bedöma prognos och övervaka behandling av lymfom. Likheterna mellan hund och människa vid lymfom, både molekylära och miljöfaktorer, gör att studier på hundar eventuellt skulle kunna appliceras inom humanvården och markörer som visats fungera hos människa skulle kunna testas även hos hund.

Det krävs dock fler studier för att få fram biomarkörer som går att använda i det dagliga kliniska arbetet. Många biomarkörer har undersökts med avseende på lymfom hos hund, vilket gör att det i framtiden förhoppningsvis kommer att finnas fler alternativ vid diagnos, prognos och behandling av lymfom.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alexandrakis, I., Tuli, R., Ractliffe, S. C., Tappin, S. W., Foale, R. D., Roos, A. & Slater, K. J. (2017). Utility of a multiple serum biomarker test to monitor remission status and relapse in dogs with lymphoma undergoing treatment with chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(1), pp 6–17.
- Binder, M., O’Byrne, M. M., Maurer, M. J., Ansell, S., Feldman, A. L., Cerhan, J., Novak, A., Porrata, L. F., Markovic, S., Link, B. K. & Witzig, T. E. (2017). Associations between elevated pre-treatment serum cytokines and peripheral blood cellular markers of immunosuppression in patients with lymphoma. *American Journal of Hematology*, 92(8), pp 752–758.
- Bryan, J. N. (2016). The Current State of Clinical Application of Serum Biomarkers for Canine Lymphoma. *Frontiers in Veterinary Science* [online], 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5042957/>. [Accessed 2018-02-08].
- Burkhard, M. J. & Bienzle, D. (2013). Making Sense of Lymphoma Diagnostics in Small Animal Patients. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(6), pp 1331–1347 (Clinical Pathology and Diagnostic Testing).
- Calvalido, J., Wood, G. A., Mutsaers, A. J., Wood, D., Sears, W. & Woods, J. P. (2016). Comparison of serum cytokine levels between dogs with multicentric lymphoma and healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182, pp 106–114.
- Costacou, T. & Levy, A. P. (2012). Haptoglobin Genotype and Its Role in Diabetic Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5(4), pp 423–435.
- Drobatz, K. J. (2009). Measures of accuracy and performance of diagnostic tests. *Journal of Veterinary Cardiology*, 11, pp S33–S40 (Supplement issue: Biomarkers in Veterinary Cardiology).
- Elliott, J. W., Cripps, P. & Blackwood, L. (2013). Thymidine kinase assay in canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(1), pp 1–13.
- Epelbaum, R., Shalitin, C., Segal, R., Valansi, C., Arselan, I., Faraggi, D., Levirov, M., Ben-Shahar, M. & Haim, N. (1998). Haptoglobin-related protein as a serum marker in malignant lymphoma. *Pathology & Oncology Research*, 4(4), pp 271–276.
- Gatt, M. E., Goldschmidt, N., Kalichman, I., Friedman, M., Arronson, A. C. & Barak, V. (2015). Thymidine Kinase Levels Correlate with Prognosis in Aggressive Lymphoma and Can Discriminate Patients with a Clinical Suspicion of Indolent to Aggressive Transformation. *Anticancer Research*, 35(5), pp 3019–3026.
- Grobman, M., Outi, H., Rindt, H. & Reiner, C. (2017). Serum Thymidine Kinase 1, Canine-C-Reactive Protein, Haptoglobin, and Vitamin D Concentrations in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia, Thrombocytopenia, and Polyarthropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(5), pp 1430–1440.
- Hammouda, N. E., Salah El-Din, M. A., El-Shishtawy, M. M. & El-Gayar, A. M. (2017). Serum Cystatin C as a Biomarker in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Scientia Pharmaceutica* [online], 85(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388146/>. [Accessed 2018-02-25].
- Henry, C. J. (2010). Biomarkers in veterinary cancer screening: Applications, limitations and

- expectations. *The Veterinary Journal*, 185(1), pp 10–14 (Special Issue: Biomarkers in Veterinary Medicine).
- Hofer, J., DeFrancesco, T. C. & Williams, L. E. (2011). Detection of tumour necrosis factor-alpha in dogs with lymphoma*. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(4), pp 290–295.
- Hunter, C. A. & Ziegler, S. F. (2015). Editorial overview: Cytokines: New roles for old friends! *Current Opinion in Immunology*, 34, pp ix–x (Antigen processing * Cytokines).
- Ishioka, K., Suzuki, Y., Tajima, K., Ohtaki, S., Miyabe, M., Takasaki, M., Mori, A., Momota, Y., Azakami, D. & Sako, T. (2013). Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Dogs Affected with Neoplasia or Inflammation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(2), pp 173–177.
- Jagarlamudi, K. K., Moreau, L., Westberg, S., Rönnerberg, H. & Eriksson, S. (2015). A New Sandwich ELISA for Quantification of Thymidine Kinase 1 Protein Levels in Sera from Dogs with Different Malignancies Can Aid in Disease Management. *PLOS ONE*, 10(9), p e0137871.
- Jagarlamudi, K. K., Westberg, S., Rönnerberg, H. & Eriksson, S. (2014). Properties of cellular and serum forms of thymidine kinase 1 (TK1) in dogs with acute lymphocytic leukemia (ALL) and canine mammary tumors (CMTs): implications for TK1 as a proliferation biomarker. *BMC Veterinary Research*, 10(1), p 228.
- Jasensky, A. K., Bondzio, A., Murugaiyan, J., Siebert, U., Roesler, U., Kohn, B. & Einspanier, R. (2014). Characterization of the native C-reactive protein (cCRP) and the corresponding liver mRNA in dogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(3), pp 462–467.
- Johnston, S. A., Thamm, D. H. & Legutki, J. B. (2014). The immunosignature of canine lymphoma: characterization and diagnostic application. *BMC Cancer* [online], 14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4168252/>. [Accessed 2018-02-12].
- Kong, F.-L., Ford, R. J. & Yang, D. J. (2013). Managing Lymphoma with Non-FDG Radiotracers: Current Clinical and Preclinical Applications. *BioMed Research International* [online], 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690206/>. [Accessed 2018-02-14].
- Ma, S., Guo, J., Lu, D., Zhu, L., Zhou, M., Zhou, D., Li, L., Zhu, J., Yang, X., Zheng, Y., Ye, X. & Xie, W. (2017). Blood biomarkers in adults with lymph node enlargement contribute to diagnostic significance of malignancy. *Oncotarget*, 8(58), pp 98533–98541.
- Marconato, L., Crispino, G., Finotello, R., Mazzotti, S., Salerni, F. & Zini, E. (2009). Serum lactate dehydrogenase activity in canine malignancies. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(4), pp 236–243.
- Marconato, L., Polton, G. A., Sabattini, S., Dacasto, M., Garden, O. A., Grant, I., Hendrickx, T., Henriques, J., Lubas, G., Morello, E., Stefanello, D., Comazzi, S. & on behalf of the European Canine Lymphoma Network (2017). Conformity and controversies in the diagnosis, staging and follow-up evaluation of canine nodal lymphoma: a systematic review of the last 15 years of published literature. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(3), pp 1029–1040.
- Mirkes, E. M., Alexandrakis, I., Slater, K., Tuli, R. & Gorban, A. N. (2014). Computational diagnosis and risk evaluation for canine lymphoma. *Computers in Biology and Medicine*, 53, pp 279–290.
- Ogasawara, S. & Stokol, T. (2012). Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced upregulation of

- tissue factor in canine peripheral blood monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(3), pp 331–336.
- Richards, K. L. & Suter, S. E. (2015). Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin lymphoma? *Immunological reviews*, 263(1), pp 173–191.
- Schleis, S. E. (2014). Cancer Screening Tests for Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44(5), pp 871–881 (Advances in Veterinary Oncology).
- Schüttler, J. & Neumann, S. (2015). Interleukin-6 as a prognostic marker in dogs in an intensive care unit. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(2), pp 223–228.
- Selting, K. A., Ringold, R., Husbands, B. & Pithua, P. O. (2016). Thymidine Kinase Type 1 and C-Reactive Protein Concentrations in Dogs with Spontaneously Occurring Cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), pp 1159–1166.
- Selting, K. A., Sharp, C. R., Ringold, R. & Knouse, J. (2015). Serum thymidine kinase 1 and C-reactive protein as biomarkers for screening clinically healthy dogs for occult disease. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(4), pp 373–384.
- Sharif, H., von Euler, H., Westberg, S., He, E., Wang, L. & Eriksson, S. (2012). A sensitive and kinetically defined radiochemical assay for canine and human serum thymidine kinase 1 (TK1) to monitor canine malignant lymphoma. *The Veterinary Journal*, 194(1), pp 40–47.
- Shrotriya, S., Walsh, D., Bennani-Baiti, N., Thomas, S. & Lorton, C. (2015). C-Reactive Protein Is an Important Biomarker for Prognosis Tumor Recurrence and Treatment Response in Adult Solid Tumors: A Systematic Review. *PLOS ONE*, 10(12), p e0143080.
- Valli, V. E., Kass, P. H., Myint, M. S. & Scott, F. (2013). Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Veterinary Pathology*, 50(5), pp 738–748.
- Withrow & MacEwen (2013). *Small Animal Clinical Oncology*. 5. ed St. Louis, Missouri: Saunders. ISBN 978-1-4377-2362-5.
- Yildirim, R., Gundogdu, M., Erdem, F., Kiki, Ihami & Bilici, M. (2009). The Levels of Serum C-Reactive Protein, Beta 2 Microglobulin, Ferritin, Lactate Dehydrogenase and Some Specific Proteins in Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma Before and After Treatment. *The Eurasian Journal of Medicine*, 41(3), pp 165–168.
- Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(2), pp 76–104.