



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Hemangiosarkoms cellulära ursprung

Louice Ekesbo

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:18

Hemangiosarkoms cellulära ursprung

The cellular origin of hemangiosarcoma

Louice Ekesbo

Handledare: *Eva Hellmén, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

Examinator: *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: *15 hp*

Nivå och fördjupning: *grund nivå, G2E*

Kurskod: *EX0700*

Utgivningsort: *Uppsala*

Utgivningsår: *2015*

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: *2015:18*

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

Nyckelord: *hemangiosarkom, hund, ursprung, ytproteiner*

Key words: *hemangiosarcoma, canine, origin, surface proteins*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
Olika subtyper av hemangiosarkom	4
von Willebrands faktor.....	5
Cluster of differentiation (CD).....	6
PDGFR- β och imatinib.....	8
Diskussion	9
Litteraturförteckning	11

SAMMANFATTNING

Hemangiosarkom är en förhållandevis vanlig tumörtyp hos hund, där den typiska patienten är en äldre tysk schäferhund. Hemangiosarkom kan vara både kutant och visceralt. De viscerala tumörerna är ofta lokaliserade till mjälte och hjärta, där en predisponering har setts till höger hjärtöra. Sjukdomsförloppet vid hemangiosarkom är snabbt och de flesta hundar dör inom ett år från det att diagnos ställs. Alla drabbade hundar hinner inte ens påbörja behandling.

Syftet med den här litteraturstudien är att undersöka vilket cellulärt ursprung hemangiosarkom har. Tumörens ursprung är inte helt klarlagt men två olika teorier finns. Den ena teorin är att hemangiosarkom härstammar från endotelceller som muterat, medan den andra teorin är att hematopoetiska progenitorceller ger upphov till tumören. En del av dagens forskning inom det här området fokuserar på att kartlägga hemangiosarkoms ursprung.

Genom att undersöka genuttrycket hos hemangiosarkomcellerna kan forskare dra slutsatser om hemangiosarkoms ursprung. Med hjälp av denna metod har forskare visat att det finns tre subtyper av hemangiosarkom, med olika typer av gener aktiverade; grupp 1 med gener associerade med angiogenes, grupp 2 med gener associerade med inflammation och grupp 3 med gener associerade med adipogenes eller lipogenes.

Ett annat sätt att försöka bestämma vilka celler som hemangiosarkom härstammar från är att undersöka vilka ytprotein som uttrycks av de maligna cellerna. Detta har gjorts i flera studier på senare år. Uttryck av flera cluster of differentiation (CD) har undersökts, i denna litteraturstudie har uttryck av CD14, CD31, CD34, CD44, CD105, CD115, CD117, CD133 och CD146 undersökts. Flera av dessa CD uttrycks vanligtvis av progenitorceller eller är associerade med endotelceller. På hemangiosarkomceller har det setts CDs som vanligtvis finns på mer differentierade endotelceller, men också CDs som är kopplade till progenitorceller som hittas i benmärgen.

Sammantaget är resultaten tvetydiga, det finns resultat som tyder på att båda teorierna skulle kunna vara korrekta. Slutsatsen är dock att det är mer troligt att hemangiosarkom hos hund härstammar från hematopoetiska progenitorceller än att det är terminalt differentierade endotelceller som ligger bakom tumörutvecklingen.

SUMMARY

Hemangiosarcoma is a common canine tumour, and the typical patient is an older German shepherd dog. Hemangiosarcoma can be both visceral and cutaneous. Amongst the visceral hemangiosarcoma the most common localisation of the tumour is the spleen and the heart, where the right auricula has been found to be predisposed. Hemangiosarcoma progresses rapidly and the majority of the dogs diagnosed with hemangiosarcoma die within one year after diagnosis, and some of the affected dogs die before starting therapy.

The aim of this literature study is to investigate the cellular origin of hemangiosarcoma. The origin of the tumour is not completely understood, although two different theories exist. The first theory is that hemangiosarcomas originate from mutated endothelial cells, whilst the other theory states that the tumour arises from hematopoietic progenitor cells. Nowadays some research within this area is being made in order to decide the ontogeny of hemangiosarcoma.

By examining the genes expressed by the hemangiosarcoma cells, researchers can deduce the origin of hemangiosarcomas. Through gene expression profiling, researchers have concluded that three different subtypes of canine hemangiosarcoma exist; group 1 with genes associated with angiogenesis, group 2 with genes associated with inflammation and group 3 with genes associated with adipogenesis or lipogenesis.

Another method used to clarify the origin of hemangiosarcomas is to examine which surface proteins that are expressed by the tumour cells. Several studies have been done using this method in recent years. The expression of several cluster of differentiations (CDs) have been examined, in this literature study the expression of CD14, CD31, CD34, CD44, CD105, CD115, CD117, CD133 and CD146 was examined. Many of these CDs are normally expressed by progenitor cells or are associated with endothelial cells. Canine hemangiosarcoma cells have been shown to express CDs associated with endothelial cells as well as CDs associated with bone marrow progenitor cells.

Taken together the results are ambiguous, there are results indicating both theories being correct. However, the conclusion is that it is more likely that canine hemangiosarcomas arise from hematopoietic progenitor cells rather than from differentiated endothelial cells.

INLEDNING

Hemangiosarkom kan uppstå spontant hos hund och utgör upp emot 7 % av hundens tumörer (Tamburini *et al.*, 2010). Tumören utvecklas främst hos äldre hundar, där medelåldern hos de som drabbas är runt 9-10 år (Waller & Rubarth, 1967; Kleine *et al.*, 1970; Brown *et al.*, 1985; Sabattini & Bettini, 2009). Vad gäller könsfördelning så varierar det mellan olika studier. Enligt Waller och Rubarth (1967), Brown *et al.* (1985) och Sabattini och Bettini (2009) tycks hemangiosarkom vara något vanligare hos hanhundar än tikar, medan Kleine *et al.* (1970) inte såg någon skillnad mellan könen. Det tycks finnas en predisponering för schäferhundar att drabbas jämfört med andra hundraser (Waller & Rubarth, 1967; Kleine *et al.*, 1970; Pearson & Head, 1976; Brown *et al.*, 1985; Sabattini & Bettini, 2009). I en studie av Pearson och Head (1976) var schäferhundar signifikant överrepresenterade bland hundarna med hemangiosarkom i studiepopulationen.

Hemangiosarkom kan vara både kutana och visceral (Sabattini & Bettini, 2009). Den vanligaste anatomiska lokaliseringen för visceral hemangiosarkom varierar mellan olika studier. Mjälten tycks vara en vanlig plats för primär lokalisering av hemangiosarkom (Pearson & Head, 1976; Brown *et al.*, 1985; Sabattini & Bettini, 2009) och i studien av Brown *et al.* (1985) hade 62 % av de studerade hundarna primärtumören i mjälten. Enligt en studie av Waller och Rubarth (1967) var däremot hjärtat det vanligaste stället, där 22 av 49 hundar hade primärtumören i hjärtat. I studien av Sabattini och Bettini (2009) var höger förmak den näst vanligaste placeringen och Waller och Rubarth (1976) framhåller att höger hjärtöra är ett typiskt predilektionsställe för hemangiosarkom.

En studie av Brown *et al.* (1985) visade på det snabba förlopp som är typiskt för hemangiosarkom, av 104 hundar dog 100 inom ett år efter diagnos och endast 69 hundar överlevde så länge att behandling hann påbörjas. Detta snabba förlopp med kort överlevnad sågs även i studier av Waller och Rubarth (1967) och Kleine *et al.* (1970). Enligt Tamburini *et al.* (2010) anses 10-15 % av alla drabbade hundar överleva ett år eller längre men även denna studie menar att de flesta hundar dör inom tre månader efter ställd diagnos.

I och med detta snabba förlopp är det viktigt att ha god kunskap om tumörens egenskaper, bland annat dess ursprung. I dagsläget är det inte känt från vilka celler hemangiosarkom uppkommer, men det finns två teorier som kommer presenteras i denna litteraturstudie. Syftet med uppsatsen är att undersöka hemangiosarkoms ursprung och försöka besvara frågan om vilken celltyp som ger upphov till hemangiosarkom.

MATERIAL OCH METODER

Uppsatsen är en litteraturstudie där sökorden "hemangiosarcoma", "dog", "canine" och "CD31" har använts vid sökning i databasen Pubmed och i databasen Web of Science har sökorden "hemangiosarcoma", "canine" och "cell origin" använts. Avgränsning i Pubmed har i vissa fall gjorts med funktionen "Other animals" under "Species". Ytterligare referenser har tagits från referenslistan till artiklar som hittats via sökning i Pubmed. För att hitta de refererade artiklarna har Pubmed i första hand använts, då med artikelns namn som sökord,

för de artiklar som inte funnits med i Pubmed har Google Scholar samt Primo sökts i. En del artiklar rekommenderade av Sciencedirect.com har också använts till denna litteraturstudie.

LITTERATURÖVERSIKT

Det finns två teorier kring hemangiosarkoms cellulära ursprung. Den ena hävdar att det är differentierade endotelceller som muterat som ligger bakom tumörbildningen (von Beust *et al.*, 1988). Den andra, och något nyare, teorin är att hemangiosarkom härstammar från mindre differentierade celler från benmärgen, så kallade hemangioblaster (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006). Enligt von Beust *et al.* (1988) är det generellt accepterat att endotelcellerna ger upphov till hemangiosarkom, men författarna framhåller att det inte finns mycket bevis för att det skulle vara så.

Olika subtyper av hemangiosarkom

Tre olika subtyper av hemangiosarkom har identifierats (Gorden *et al.*, 2014). Forskarna tog 24 prover från hela tumörer, olika primära visceral hemangiosarkom, från 20 hundar och gjorde fullskalig genanalys av tumörerna. Utifrån resultatet av genanalysen delades tumörerna in i olika grupper, utifrån vilka gener som överuttrycktes. Grupp 1 karakteriserades av gener kopplade till angiogenes (inkluderande blodkärlsutveckling, angiogenes, vaskulogenes, endotelcellsutveckling och migration), grupp 2 karakteriserades av gener kopplade till inflammation (inkluderande differentiering, homeostas och utveckling av immunceller och migration) och grupp 3 karakteriserades av gener kopplade till adipogenes eller lipogenes (inkluderande lipid- och kolesteroltransport och fettsyre-, kolesterol- och steroidmetabolism). Ras, lokalisering av primärtumör, vilken individ tumören kom från eller morfologisk subtyp av tumören påverkade inte vilken grupp som tumören placerades i utifrån genotyp. 47 prover undersöktes med RNA-sekvenseringsanalys vilket visade liknande indelning i tre grupper, och konfirmerade alltså resultatet från den fullskaliga genanalysen (Gorden *et al.*, 2014).

I en tidigare studie har Tamburini *et al.* (2010) visat att gener kopplade till inflammation och angiogenes är överuttryckta i hemangiosarkom, jämfört med andra tumörer och hematom. Studien av Gorden *et al.* (2014) visar också att en mindre del av undersökta hemangiosarkom verkar ha uppreglerade gener inblandade i adipogenes och lipogenes. Tamburini *et al.* (2010) jämförde genprofilen hos hemangiosarkom med andra tumörtyper (osteosarkom, leukemi och non-Hodgkins lymfom) och resultatet visade att de gener som uttrycks i hemangiosarkom skiljer sig från de gener som uttrycks i de andra maligna tumörerna. Förändringarna vid hemangiosarkom är alltså inte de som generellt sker vid tumörömvandling, utan mer specifika för just denna tumörtyp. Forskarna gjorde analys av 58 prover där hemangiosarkom skiljde sig från de övriga tumörerna och resultatet visade att uttrycket av cirka 30 av dessa gener var relativt unika för hemangiosarkom. Gener som uttrycktes i högre utsträckning i hemangiosarkom var bland annat VEGFA (vascular endothelial growth factor A), TIMP-1 (TIMP metalloproteinase inhibitor 1) och TNF α (tumour necrosis factor alpha) (Tamburini *et al.*, 2010).

Celler kan växa som sfärer och detta är karakteristiskt för normala stamceller. För att finna de cancerceller som utgör grunden för tumörer, s.k. cancerstamceller, kan celler från cancercellinjer odlas som sfärer. Det är endast cancerceller med stamcellsegenskaper som kan bilda sfärer i cellkulturer. När celler odlas på detta sätt ses autonom tillväxt och cellerna kan dela sig och ge upphov till fler, lika odifferentierade, celler (self-renewing). Gorden *et al.* (2014) odlade celler från hemangiosarkomcellinjer (SB-HSA, Frog och Emma) som sfärer och undersökte deras genuttryck. De såg att dessa celler överuttryckte gener associerade med de tre olika subtyperna som de identifierat vid hemangiosarkom hos hund. Forskarna tolkade resultatet som att de tre subtyperna av hemangiosarkom ursprungligen kommer från en gemensam multipotent cell och framhöll att om detta stämmer ska sfärcellerna uppvisa egenskaper från de tre olika subtyperna (Gorden *et al.*, 2014).

Forskarna undersökte om cellerna odlade som sfärer hade egenskaper som gick att koppla till de tre olika subtyperna av hemangiosarkom. Detta gjordes genom att undersöka om lipiddroppar bildades i cellerna, om de hade förmåga till fagocytos, samt vilka ytproteiner som uttrycktes av cellerna. I grupp 1 undersöktes endast uttryck av ytproteiner, och de resultaten finns längre ned under rubriken ”Cluster of differentiation (CD)”. Cellernas förmåga till fagocytos undersöktes för att öka säkerheten på att sfärcellerna hade fått myeloida egenskaper, kopplat till grupp 2. Forskarna såg att fagocytosförmågan hos celler odlade som sfärer var högre än hos de som var odlade i monolager. (Gorden *et al.*, 2014).

För att undersöka om cellerna fått egenskaper kopplade till adipogenes (grupp 3) undersöktes om lipiddroppar bildades i cellerna från tre olika cellinjer (SB-HSA, Frog och Emma). I samtliga cellinjer sågs lipiddroppar när cellerna var odlade som sfärer, men inte när de var odlade i monolager. Sammantaget såg forskarna att när hemangiosarkomcellinjerna odlades som sfärer visade de på egenskaper från samtliga tre subtyper och att de kunde differentiera ut till endera av de tre subtyperna (Gorden *et al.*, 2014).

von Willebrands faktor

En faktor som fungerar som cellmarkör för endotelceller är Faktor VIII-relaterad antigen (Jaffe *et al.*, 1973) som även kallas von Willebrands faktor (vWF) (Ferrer *et al.*, 1995). vWF uttrycks i granulationsvävnad (endotelceller) men i hemangiom är vWF frånvarande eller har ett lågt uttryck (Sabattini & Bettini, 2009). Ferrer *et al.* (1995) undersökte huruvida friska endotelceller reagerade på en antikropp riktad mot vWF och såg att samtliga blodkärlsendotel förutom endotelceller i njurarnas glomeruli reagerade, samt att lymfkärlsendotelet också reagerade positivt om än svagare än blodkärlsendotel.

I en studie av von Beust *et al.* (1988) var ca 90 % av hemangiosarkomen hos hundar positiva för faktor VIII-relaterad antigen. I en studie av Sabattini och Bettini (2009) varierade uttrycket av vWF i hemangiosarkom, majoriteten av proverna hade ett svagt och oregelbundet uttryck och endast 12 % uttryckte vWF starkt. Det har setts en koppling mellan uttryck av vWF och differentieringsgrad, ju lägre differentierat hemangiosarkom, desto lägre uttryck av

vWF (Sabattini & Bettini, 2009). I vissa fall kan bakgrundsinfärgning ske, särskilt när kärlen innehåller serum, vilket gör det svårare att identifiera endotelcellerna (Ferrer *et al.*, 1995).

Hemangiosarkom skiljer sig från andra neoplasier (fibrosarkom, schwannom och hemangiopericytom) avseende uttryck av vWF. I en studie där sex vävnadsprover från de tre olika tumörtyperna analyserades med immunohistokemi, var inget vävnadsprov positivt för vWF, att jämföra med 11 av 15 prover från hemangiosarkom som var klart positiva. Endast två hemangiosarkomprover var negativa och de proverna kom från lågt differentierade tumörer (Ferrer *et al.*, 1995).

Cluster of differentiation (CD)

Hemangiosarkomceller uttrycker flera olika ytproteiner, så kallade cluster of differentiation (CD); CD14, CD31, CD34, CD44, CD105, CD115, CD117 (c-kit), CD133 och CD146 (Ferrer *et al.*, 1995; Gorden *et al.*, 2014; Sabattini & Bettini, 2009).

CD14 och CD115 (CSF-1R) uttrycks normalt sett av myeloida progenitorceller som ursprungligen kommer från benmärgen medan CD34, CD117 och CD133 uttrycks av endoteliala och hematopoetiska progenitorceller (Gorden *et al.*, 2014). CD105 och CD146 är associerade med endotelcellsproliferation och uttrycks av mogna endotelceller (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006; Gorden *et al.*, 2014) och CD31 (PECAM) uttrycks av samtliga endotelceller hos hund (Ferrer *et al.*, 1995). CD44 har flera funktioner, det är en adhesionsmolekyl som är involverad i cell-cell- och cell-matrix-interaktioner, och signalering vid hematopoes (Sabattini & Bettini, 2009).

När Gorden *et al.* (2014) undersökte uttrycket av CD14 och CD115 på celler från tre olika hemangiosarkomcellinjer (SB-HSA, Frog och Emma) sågs att cellmarkörerna uttrycktes i större utsträckning när cellinjen odlades som sfärer än i monolager i två av de tre cellinjerna (SB-HSA och Frog). Uttrycket av CD115 kan vara ett tecken på att differentierade hematopoetiska celler interagerar med mogna endotelceller för att främja angiogenes och på så vis bidra till hemangiosarkomets tillväxt (Gorden *et al.*, 2014). I en studie av Lamerato-Kozicki *et al.* (2006) undersöktes uttrycket av CD14 i sex olika hemangiosarkomcellinjer (DD-1, Dal-4, CHAD-G4.1, CHAD-B7.4, Mocha-HSA och Frog-HSA) och forskarna såg med immunofluorescensinfärgning att uttrycket var varierande.

Andelen celler som uttrycker CD34, CD117 och CD133 är högre när cellerna odlas som sfärer än i monolager (Gorden *et al.*, 2014). I studie av hemangiosarkomcellinjer (DD-1, Dal-4, CHAD-G4.1, CHAD-B7.4, Mocha-HSA och Frog-HSA) visades med flödescytometri och immunofluorescensmikroskopi att CD133 och c-kit (CD117) uttrycks i samtliga cellinjer men att uttrycket av CD34 varierar mellan cellinjerna (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006). Varierande uttryck har också setts när CD117-uttrycket undersökts med immunohistokemi i vävnadsprov från hemangiosarkom, det sågs också att en majoritet av proverna uttryckte CD117 (Sabattini & Bettini, 2009). Uttrycket av CD117 i hemangiosarkomceller är signifikant större än uttrycket i hemangiom och granulovävnad (Sabattini & Bettini, 2009). En minoritet av

hemangioproverna uttryckte CD117 men i de flesta prover från granulationsvävnad sågs ett svagt uttryck, förutom de prover som hade en låg nivå av angiogenes (Sabattini & Bettini, 2009).

I en studie av Fosmire *et al.* (2004) såg forskarna att CD117 uttrycktes av hemangiosarkom men det kunde inte upptäckas i hematom. Gorden *et al.* (2014) ansåg att uttrycket av de cellmarkörer som finns på endotel och hematopoetiska progenitorceller stödjer teorin att hemangiosarkom uppkommer från angioblastiska progenitorceller från benmärgen. Uttrycket av CD117 i hemangiosarkom tyder på att tumören utvecklas från primitiva, lågt differentierade endotelceller som kan identifieras med hjälp av CD117 (Fosmire *et al.*, 2004; Sabattini & Bettini, 2009).

När Lamerato-Kozicki *et al.* (2006) undersökte ytmarkörer hos hemangiosarkomcellinjer såg forskarna att uttrycksmönstret av c-kit (CD117)/CD34/CD133 och $\alpha_v\beta_3$ -integrin tillsammans med det faktum att inget uttryck av leukocyt-specifika markörer hittades, verkade vara unikt för hemangiosarkom. Forskargruppen såg även uttryck av c-kit (CD117), CD45 (ett annat ytprotein som kopplas till hematopoetiska prekursorer) och $\alpha_v\beta_3$ integrin i cirkulerande celler som inte var blodkroppar då de hade högre autofluorescens än vita blodkroppar och cellernas ljusspridningsegenskaper liknade de egenskaper som setts hos odlade hemangiosarkomceller.

Uttrycket av CD44 i hemangiosarkom går inte att förutsäga med hjälp av hemangiosarkomcellinjer (Tamburini *et al.*, 2010). Tamburini *et al.* (2010) såg att genuttrycket av CD44 från en hemangiosarkomcellinje var förhöjt jämfört med uttrycket hos ett hematom, men när ett vävnadshemangiosarkom testades var det ingen betydande skillnad mellan hemangiosarkom och hematom. Sabattini och Bettini (2009) däremot såg med immunohistokemi ett signifikant högre uttryck av CD44 i hemangiosarkom jämfört med hemangiom, men att det inte var någon signifikant skillnad mellan hemangiosarkom och granulationsvävnad. Reaktiva prover av granulationsvävnaden har setts ha ett lågt uttryck av CD44 medan prover med en låg nivå av angiogenes inte uttryckte CD44 (Sabattini & Bettini, 2009).

I en studie av Fosmire *et al.* (2004) såg författarna att alla testade hemangiosarkom från hund uttryckte CD31. Även lågt differentierade hemangiosarkom har setts uttrycka CD31 (Ferrer *et al.*, 1995). Det har observerats att hemangiosarkom skiljer sig från andra tumörtyper (fibrosarkom, schwannom och hemangiopericytom) gällande uttryck av CD31. Av 6, med immunohistokemi analyserade, prover från dessa neoplasier var ingen positiv för CD31, till skillnad från hemangiosarkom (och även hemangiom) där samtliga 15 prover var positiva (Ferrer *et al.*, 1995).

Eftersom CD31 uttrycks av samtliga endotelceller, och även hemangiosarkom, är det en användbar cellmarkör vid framtagning av hemangiosarkomcellinjer. När Akhtar *et al.* (2004) etablerade cellinjen SB-HSA togs de ursprungliga tumörcellerna från en nioårig schäfer med subkutant hemangiosarkom. Vid urval av de celler som skulle bilda cellinjen användes direkt tvåfärgsimmunofluorescensmärkning av $\alpha_v\beta_3$ -integrin och CD146 för att sortera ut celler som skulle användas till cellinjen. De celler som fick tydligast positiv infärgning för uttryck av

CD146 och $\alpha_v\beta_3$ -integrin valdes ut för att etablera cellinjen SB-HSA. FISH-analys (fluorescence in situ hybridization) av SB-HSA konstaterade att kromosomerna i cellerna var från hund. Celler från cellinjen injicerades sedan i immunsupprimerade möss (bg/nu/XID och NOD-SCID) och sågs bilda hemangiosarkom. De bildade tumörerna undersöktes med immunohistokemi och infärgning visade på närvaro av CD146, CD31 och $\alpha_v\beta_3$ -integrin.

$\alpha_v\beta_3$ integrin, CD146 och CD105 representerar cellulära funktioner kopplade till subtyp 1 (angiogenes) som Gorden *et al.* (2004) identifierade och forskargruppen har undersökt uttryck av de cellmarkörerna i tre olika hemangiosarkomcellinjer (SB-HSA, Frog och Emma). Forskarna såg att hemangiosarkomcellinjerna uttryckte de tre ytproteinerna och de undersökte också om det var någon skillnad i uttryck om cellerna var odlade i monolager eller som sfärer. Författarna såg att uttryck av CD105 och $\alpha_v\beta_3$ integrin inte varierade beroende på hur cellerna odlats eller vilken cellinje de tillhörde men att uttrycket av CD146 varierade mellan olika cellinjer. Närvaro av CD146 i cirkulerande hemangiosarkomceller samt i sex olika hemangiosarkomcellinjer har setts av Lamerato-Kozicki *et al.* (2006) och de forskarna har också sett att $\alpha_v\beta_3$ integrin uppregleras av endotelceller i samband med aktivering som leder till proliferation.

PDGFR- β och imatinib

Imatinib är en tyrosinkinaserceptorhämmare (TKI) som används vid cancerbehandling. Vid cancer ses ofta ett onormalt uttryck av tyrosinkinaserceptorer (RTK) och med immunohistokemi har det setts att platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR- β) och c-kit uttrycks hos över 50 % av hemangiosarkomcellerna (Dickerson *et al.*, 2013). PDGFR- β är en RTK som medierar cellproliferation. När en ligand binder in till receptorn aktiveras Ras-proteinet för vidare signalen via MAP-kinas-kaskaden vilket i sin tur kan påverka genuttryck och proteinaktivitet.

Dickerson *et al.* (2013) har visat att när PDGFR- β i hemangiosarkomceller tystats med siRNA (small interfering RNA) fås en minskad tillväxt av tumörcellerna, vilket författarna tolkar som att signalering genom PDGFR- β är viktigt för hemangiosarkomcellernas överlevnad. De har visat att imatinib kan hämma tyrosinfosforyleringen av PDGFR- β hos hund med ett dosberoende samband (Dickerson *et al.*, 2013).

Dickerson *et al.* (2013) såg också att imatinib som gavs till möss med hemangiosarkom gav en långsammare storleksökning av tumörerna, jämfört med de möss som fick placebo (fosfatbuffrad saltlösning, PBS). Även här hade imatinib en dosberoende effekt. Resultatet skulle kunna tyda på att imatinib kan hämma hemangiosarkomtillväxten och att imatinib, eller andra TKI, skulle kunna vara användbara vid behandling av hemangiosarkom (Dickerson *et al.*, 2013). Forskarna tänkte sig att anledningen till att imatinib kan hämma hemangiosarkomtillväxten är att det stör PDGFR- β /PDFR-signaleringen som i sin tur påverkar angiogenesen i tumörerna.

En annan TKI, dasatinib, har testats för att se om den kunde ge högre plasmakoncentration efter oral administration (Dickerson *et al.*, 2013). Dasatinibs målreceptorer är bland annat PDGFR- β och c-kit. Forskarna såg i *in vitro*-studier att dasatinib hämmade hemangiosarkomens proliferation hos hundar mer effektivt än imatinib och koncentrationen dasatinib som krävdes för att hämma PDGFR- β *in vitro* var ungefär 1000 gånger lägre än den koncentration av imatinib som krävdes för att få samma effekt.

DISKUSSION

I litteraturen förekommer flera studier där forskare undersöker uttrycket av ytproteiner i hemangiosarkom. Ofta undersöker de sådana ytproteiner som tidigare inte studerats, vilket gör det svårt att jämföra olika artiklars resultat. De flesta studier som undersöker ytproteinsuttryck tycks vara förhållandevis nya och jag tror därför att det kommer finnas mer data att jämföra med om några år.

Ett problem som tas upp av författare till studier som undersöker celluttryck av ytproteiner är att det inte går att vara helt säker på att de celler som undersöks endast är celler från tumörer. Bakgrundsinfärgning kan ske, särskilt om kärlen innehåller serum, och det gör det svårt att identifiera endotelcellerna (Ferrer *et al.*, 1995). I hemangiosarkom är det gott om blodceller och om blodcellernas ytproteiner är samma som de ytproteiner som undersöks kan de bli infärgade och påverka resultatet. Ett sätt att komma runt detta är att undersöka olika hemangiosarkomcellinjer. I cellinjerna kan forskarna vara helt säkra på att det enbart är den önskade typen av celler som undersöks, men det finns också en risk att cellinjerna har ändrats eftersom det ständigt kan ske mutationer vid celledelning. Jag tror att det bästa är att göra en kombination av försök på celler från cellinjer och celler från hemangiosarkom tagna från drabbade hundar, för att kunna jämföra uttryck hos de två typerna av celler (*in vitro* respektive *in vivo*) och på så vis komma närmare det verkliga resultatet.

Majoriteten av artiklarna handlar om att hitta bevis för att det är progenitorceller som orsakar hemangiosarkom. Det finns få nya artiklar som arbetar utifrån teorin att hemangiosarkom utgår från endotelceller, och de flesta forskare verkar positiva till att det är progenitorceller från benmärgen. Detta tror jag skulle kunna påverka slutsatsen i flera av studierna, då forskarna kan tolka resultatet på ett sådant vis att det stödjer den teori de själva mest tror på.

Studiepopulationens storlek är också viktigt för att få ett trovärdigt resultat i forskningen. När det gäller tumörer kan det vara svårt att få tillgång till tillräckligt många prover för att få en studiepopulation som är stor nog för att kunna dra några slutsatser. I en studie av Lamerato-Kozicki *et al.* (2006) framhöll forskarna att de inte hade tillräckligt stor studiepopulation för att kunna dra några slutsatser om det finns någon koppling mellan tumörens anatomiska lokalisering och dess fenotyp. I studien drog de slutsatser om hemangiosarkoms ursprung, oberoende av anatomisk placering, och jag tänker att om det finns en koppling mellan ursprung och placering kan detta påverka resultatet. Personligen tror jag dock inte att detta är så troligt och en senare studie, med större studiepopulation, har inte funnit någon koppling mellan anatomisk lokalisering av tumören och dess genuttryck (Gorden *et al.*, 2014).

Om hemangiosarkom uppstår på grund av tumöromvandling av hemangioblaster i benmärg/cirkulation skulle det kunna leda till att hemangiosarkom uppstår i flera organ samtidigt utan att det handlar om metastasering. Det skulle då vara cirkulerande maligna celler som på något vis hamnar i ett organ och börjar dela sig så att en tumör bildas, på liknande sätt som bakterier eller pus cirkulerar och ger upphov till abscesser i flera organ. Det har setts att hemangiosarkom är vanligare i hjärta och mjälte (Sabattini & Bettini, 2009; Waller & Rubarth, 1967), två organ med rik blodförsörjning, och om de tumöromvandlade cellerna finns i cirkulationen skulle det vara störst risk att hemangiosarkom utvecklas i organ med rik blodförsörjning.

I studien av Gorden *et al.* (2014) diskuterar författarna om huruvida de tre olika subtyperna av hemangiosarkom som de upptäckte i sin studie kan representera olika stadier i hemangiosarkomutvecklingen. I hemangiom har tre olika stadier setts; I) endotelcellsproliferation utan kärlbildning, II) involution, då kärlformation sker, och III) blodkärlen ersätts av fibrösa rester med fettceller i vilket ofta leder till spontan tillbakagång av tumören. Gorden *et al.* (2014) diskuterar att det skulle kunna vara så att den subtyp som är kopplad till adipogenes i själva verket är ett slutstadium i differentieringen hos cellerna som ger upphov till hemangiosarkom. Jag tycker att detta låter som en intressant tolkning av fyndet av de tre subtyperna. Jag skulle vilja se mer forskning på ämnet, eftersom det vore användbart att kunna identifiera vilket stadium tumören är i vid diagnos och behandling.

En studie av Lamerato-Kozicki *et al.* (2006) hade som mål att ta reda på huruvida hemangiosarkomceller härstammade från mogna endotelceller eller från hemangioblaster. I sin diskussion drar de slutsatsen att det är mest troligt att hemangiosarkom härstammar från benmärgsprekursorer som stannar i utvecklingen vid steget mellan hemangioblaster och angioblaster, detta på grund av de ytproteiner som uttrycks (c-kit, CD34, CD133 och i vissa fall CD45). Författarna framhåller att det inte helt går att utesluta att hemangiosarkom härstammar från endotelceller som muterat, men de ser det inte som så troligt att alla tumöromvandlade celler skulle reaktivera liknande uttrycksprofiler för dessa ytproteiner som är kopplade till hemangioblastlinjen.

Forskarna diskuterar även fyndet med cirkulerande celler som var positiva för c-kit, $\alpha_v\beta_3$ integrin, CD133 och CD146. En möjlighet är att det var friska endoteliala prekursorceller (EPC) som frisätts i samband med anemi, men eftersom endast ett fåtal hundar var anemiska anser de inte att det är troligt. En annan lösning är att cytokiner som utsöndras från tumören gör att friska EPC frisätts, något som författarna inte heller anser vara troligt eftersom uttrycket av cytokinen VEGF (vascular endotelial growth factor) tycks vara detsamma i hemangiosarkom som hematom. De framhåller dock att andra cytokiner skulle kunna frisättas från tumören och orsaka frisättning av EPC från benmärgen.

En annan anledning till att de inte tror att cytokiner från tumörerna ger frisättning av EPC till cirkulationen är att de endoteliala prekursorcellerna har tydlig fenotyp av ytmarkörer, men mönstret av ytmarkörerna är olika mellan olika hundar med hemangiosarkom och författarna anser att EPC som mobiliserats med cytokiner frisatta från tumören bör ha liknande fenotyper hos alla hundar. Författarna kunde endast jämföra fenotypen hos de cirkulerande EPC med

EPC funna i hemangiosarkom i ett fall, och dessa visade förväntade likheter i uttryck av cellytemarkörer. De framhåller också att CD133-positiva celler är de tidigaste identifierbara multipotenta cellerna i hemangioblastiska linjen, vilket tyder på att det är tumörstamceller (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006).

Jag anser efter denna studie att det är mest troligt att hemangiosarkom härstammar från benmärgsprekursorceller. Detta för att närvaro av flera ytproteiner, så som c-kit, CD34, CD133 och CD117, som är kopplade till prekursorceller, har setts uttryckas på hemangiosarkomceller. Det finns även studier som visat på närvaro av ytproteiner som normalt sett ses hos mogna endotelceller, tex. CD31 och vWF. De författare som drar slutsatser kring hemangiosarkoms ursprung pekar samtliga på att det är prekursorceller som ligger bakom tumörutvecklingen, och när flera forskare kommer till samma slutsats blir den slutsatsen mer trolig. I studien av Tamburini *et al.* (2010) framkom att forskarna fått preliminära data från sitt laboratorium som visar på förekomsten av sällsynta progenitorceller i hemangiosarkom som ansvarar för förökning av cellinjen *in vitro*, detta skulle också kunna stödja teorin om att hemangiosarkom härstammar från en progenitorcell. Jag anser att mer forskning behövs på området för att kunna klargöra helt hur hemangiosarkom uppstår.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Akhtar, N., Padilla, M.L., Dickerson, E.B., Steinberg, H., Breen, M., Auerbach, R. & Helfand, S.C. (2004). Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model. *Neoplasia* 6(2), 106-116.
- Brown, N.O., Patnaik, A.K. & MacEwen, E.G. (1985). Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *J Am Vet Med Assoc* 186(1), 56-8.
- Dickerson, E.B., Marley, K., Edris, W., Tyner, J.W., Schalk, V., MacDonald, V., Loriaux, M., Druker, B.J. & Helfand, S.C. (2013). Imatinib and Dasatinib Inhibit Hemangiosarcoma and Implicate PDGFR-beta and Src in Tumor Growth. *Translational Oncology* 6(2), 158-U223.
- Ferrer, L., Fondevila, D., Rabanal, R.M. & Vilafranca, M. (1995a). Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *J Comp Pathol* 112(4), 319-26.
- Ferrer, L., Fondevila, D., Rabanal, R.M. & Vilafranca, M. (1995b). Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *Journal of Comparative Pathology* 112(4), 319-326.
- Fosmire, S.P., Dickerson, E.B., Scott, A.M., Bianco, S.R., Pettengill, M.J., Meylemans, H., Padilla, M., Frazer-Abel, A.A., Akhtar, N., Getzy, D.M., Wojcieszyn, J., Breen, M., Helfand, S.C. & Modiano, J.F. (2004). Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium. *Lab Invest* 84(5), 562-72.
- Gorden, B.H., Kim, J.H., Sarver, A.L., Frantz, A.M., Breen, M., Lindblad-Toh, K., O'Brien, T.D., Sharkey, L.C., Modiano, J.F. & Dickerson, E.B. (2014). Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *Am J Pathol* 184(4), 985-95.
- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. & Nachman, R.L. (1973). Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52(11), 2757-64.
- Kleine, L.J., Zook, B.C. & Munson, T.O. (1970). Primary cardiac hemangiosarcomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 157(3), 326-37.

- Lamerato-Kozicki, A.R., Helm, K.M., Jubala, C.M., Cutter, G.C. & Modiano, J.F. (2006). Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Exp Hematol* 34(7), 870-8.
- Parums, D.V., Cordell, J.L., Micklem, K., Heryet, A.R., Gatter, K.C. & Mason, D.Y. (1990). JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 43(9), 752-7.
- Pearson, G.R. & Head, K.W. (1976). Malignant haemangioendothelioma (angiosarcoma) in the dog. *J Small Anim Pract* 17(11), 737-45.
- Sabattini, S. & Bettini, G. (2009). An Immunohistochemical Analysis of Canine Haemangioma and Haemangiosarcoma. *Journal of Comparative Pathology* 140(2-3), 158-168.
- Tamburini, B.A., Phang, T.L., Fosmire, S.P., Scott, M.C., Trapp, S.C., Duckett, M.M., Robinson, S.R., Slansky, J.E., Sharkey, L.C., Cutter, G.R., Wojcieszyn, J.W., Bellgrau, D., Gemmill, R.M., Hunter, L.E. & Modiano, J.F. (2010). Gene expression profiling identifies inflammation and angiogenesis as distinguishing features of canine hemangiosarcoma. *Bmc Cancer* 10, 16.
- von Beust, B.R., Suter, M.M. & Summers, B.A. (1988). Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Vet Pathol* 25(4), 251-5.
- Waller, T. & Rubarth, S. (1967). Haemangioendothelioma in domestic animals. *Acta Vet Scand* 8(3), 234-61.