



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Aktiviteten hos thymidinkinas 1 i serum från hundar med juvertumörer och malignt lymfom

Olof Sjöbring

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:59*

Aktiviteten hos thymidinkinas 1 i serum från hundar med juvertumörer och malignt lymfom

Olof Sjöbring

*Handledare: Henrik von Euler, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för
hund, katt och andra smådjur*

*Biträdande handledare: Sara Westberg, Universitetsdjursjukhuset i Uppsala,
smådjurskliniken*

*Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper, Avdelningen för
klinisk kemi*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30 hp*

Nyckelord: Thymidinkinas1, juvertumörer, malignt lymfom

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697*

Examensarbete 2011:59:

INNEHÅLL

Sammanfattning	2
Summary	2
Syfte	3
Litteraturoversikt	3
Juvertumörer hos hund	3
Etiologi och riskfaktorer	3
Förekomst och klassificering	4
Metastasering	5
Klinisk bild och diagnos	6
Staging	6
Behandling	7
Prognos och överlevnad	8
Malignt lymfom hos hund	9
Förekomst, etiologi och riskfaktorer	9
Klinisk bild och klassificering	10
Diagnos och staging	11
Behandling	13
Prognos och överlevnad	14
Thymidinkinas som diagnostiskt hjälpmedel vid cancer hos människa och hund	15
Mätning av TK1-koncentrationen	15
Mätning av TK1-aktiviteten	16
Material och metoder	18
Material	18
Thymidinkinasanalys	19
Statistisk analys	19
Resultat	19
Analysoptimering	19
TK-aktivitet i serum hos normala och sjuka hundar	19
TK-aktivitet i serum hos hundar efter kemoterapi	21
Korrelation mellan [³ H]-dThd-analysen och TK-REA	22
Diskussion	24
Tack till:	25
Litteraturförteckning	26
Bilagor	28

SAMMANFATTNING

Inom humanmedicinen har man i flera decennier använt sig av olika biomarkörer som hjälpmedel vid diagnosticering, prognosställande och monitorering av sjukdomens progression hos patienter med neoplastiska sjukdomar. Tumörmarkörer är ett område som under senare år även har fått ökat intresse inom veterinärmedicinen och forskning bedrivs nu runt flera olika typer av markörer. Den tumörmarkör som visat sig vara känsligast och mest pålitlig vid studier kring hematologiska tumörsjukdomar hos såväl hundar som människor är enzymet thymidinkinase 1 (TK1). TK1 är ett cellcykelreglerat S-fas-specifikt protein vars fysiologiska funktion är att medverka i cellens syntes av deoxiribonukleinsyra (DNA) genom att omvandla nukleotiden thymidin till motsvarande monofosfat. Enzymets aktivitet går att mäta i serum och korrelerar starkt till malignitetsgraden hos den vävnad som enzymet uttrycks i. Gold standard-metoden för att mäta aktiviteten hos TK1 inom veterinärmedicinen är idag en radioenzymatisk analys (TK-REA) och på senare tid har forskning även bedrivits kring en metod som bygger på ELISA-teknik. Tillgängligheten hos båda nämnda analysformer är dock kraftigt begränsad, bland annat på grund av att de kräver mycket dyr utrustning från företaget som utvecklat dem, varför de i nuläget inte används i stor utsträckning inom den kliniska veterinärmedicinen. En ny metod för mätning av TK1-aktiviteten som baseras på fosforyleringen av thymidin inmärkt med radioaktivt tritium ($[^3\text{H}]$ -dThd) har nu utarbetats på Sveriges Lantbruksuniversitet.

Syftet med studien är att utvärdera huruvida den nya metoden är tillräckligt känslig för att mäta TK1-aktivitet i serum från hundar med malignt lymfom och juvertumörer. Serumprover från 68 hundar (40 normala, 25 med malignt lymfom och tre med juvertumörer) analyserades med $[^3\text{H}]$ -dThd-analysen. Aktiviteten hos TK1 i serum från patienter med malignt lymfom var signifikant högre jämfört med aktiviteten hos friska hundar. Endast tre patienter med juvertumörer inkluderade i studien och alla av dem visade en TK-aktivitet under medelvärdet för den friska gruppen. TK1-aktiviteten mättes även i serumprover insamlade före, under och efter kemoterapi-behandling av sju hundar med malignt lymfom. Ett tydligt behandlingssvar i form av minskad TK1-aktivitet i serum observerades, vilket bekräftade att TK-aktivitet i serum är en god diagnostisk och prognostisk markör. Resultaten korrelerade med indexmetoden TK-REA ($p < 0,0001$). Sammanfattningsvis är ($[^3\text{H}]$ -dThd)-metoden snabb, känslig och ekonomiskt fördelaktig i syfte att mäta TK-aktivitet i serum från patienter med malignt lymfom.

SUMMARY

Tumor specific bio markers have during several decades been a tool used for diagnosis, prognosis and monitoring disease in human oncology. More recently, the interest for tumor markers has increased also within veterinary medicine, and studies are now undertaken on several different types of markers. The tumor marker that has proven to be the most sensitive and reliable through studies on hematologic tumors in both human and dog is the enzyme thymidine kinase 1 (TK1). TK1 is an enzyme specific for the S-phase of the cell cycle and its physiologic role is taking part in the production of deoxyribonucleic acid (DNA) by catalyzing the phosphorylation of the nucleotide thymidine to its corresponding

monophosphate. The activity of the enzyme can be measured in serum and strongly correlates with the degree of malignancy of the tissue that produces the enzyme. Today, the Gold-standard method for measuring serum-TK1 activity in veterinary medicine is a radiometric assay (TK-REA) and recently, research has also been made on an ELISA-technique based method. The availability of the methods though, is strongly restricted since both of them require expensive equipment solely provided by the company that has developed them, resulting in that the methods are used to little extent within veterinary medicine. However, the method for measuring serum-TK1 activity, based on the phosphorylation of thymidine labeled with radioactive tritium ($[^3\text{H}]\text{-dThd}$), has recently been refined at the Swedish University of Agriculture Science.

The purpose of this study is to evaluate whether the new method is sensitive enough to measure TK1 activity in sera from dogs with malignant lymphoma and mammary tumors. Serum samples from 68 dogs (40 normal, 25 with malignant lymphoma and three dogs with mammary tumors) were analyzed using the $[^3\text{H}]\text{-dThd}$ analysis. The serum-TK1 activity in patients with malignant lymphoma was significantly higher compared to the activity of normal dogs. Only three patients with mammary tumors were included in the study and all of them had a serum-TK1 activity below the mean value for the healthy control group. We also measured the serum-TK1 activity in samples collected before, during and after chemotherapy of seven dogs with malignant lymphoma. A clear response to therapy in terms of decreased serum-TK1 activity was observed, which confirmed that serum-TK1 activity is a good diagnostic and prognostic marker. The results significantly correlated with the Gold-standard TK-REA ($p < 0.0001$). In conclusion the new method is fast, sensitive and economic for measuring serum-TK activity in patients with malignant lymphoma.

SYFTE

Tonvikten i denna artikel ligger på en litteraturstudie av biomarkörer för cancer hos hund och människa, med fokus på thymidinkinas 1. Vidare ges utförliga beskrivningar av tumörsjukdomarna malignt lymfom och juvertumörer. En mindre studie har utförts i syfte att validera en ny metodik för att snabbare och billigare analysera thymidinkinas 1 hos hund.

LITTERATURÖVERSIKT

Juvertumörer hos hund

Etiologi och riskfaktorer

Juvertumörer hos små hundraser är oftare benigna än de som utvecklas hos stora hundraser. Vissa raser är speciellt benägna att utveckla juvertumörer, t.ex. flera spaniel-raser (Egenvall *et al.*, 2005). De flesta drabbade djur är medelålders till äldre, intakta tikar. Juvertumörer är däremot sällsynt hos hanhundar och unga individer. Både östrogener och gestagener ökar incidensen, och dessa kan vara av både endogent och exogent ursprung (Nelson & Couto, 2009 [a]). Risken att en hund ska drabbas av juvertumörer minskar om den kastreras före andra löpet, och risken minskar ytterligare om kastration sker redan före det första löpet. Kastration efter tredje löpet minskar däremot inte risken för att utveckla maligna tumörer,

troligen beroende på att steroida könshormoner vid det laget redan haft sin primära verkan på målcellerna. Produkter som innehåller medroxiprogesteronacetat, som bland annat används för att skjuta upp löp hos tik, har också kopplats till en ökad incidens av juvertumörer. Andra riskfaktorer är fetma vid ung ålder samt om hunden utfodras med hemmalagad mat istället för kommersiellt foder (Henry, 2010).

Förekomst och klassificering

Juvertumörer är den vanligaste tumörtypen hos okastrerade tikar (Sorenmo, 2003). De bakersta juverdelarna drabbas oftare än de främre, troligen p.g.a. att de är större (och således innehåller mer juvervävnad) (Dobson *et al.*, 2003).

I *Ruta 1* visas den histologiska klassificeringen av juvertumörer hos hund. Benigna tumörer utgörs ofta av olika typer av adenom, fibroadenom och blandtumörer (Lana *et al.*, 2007). Drygt 50 % av juvertumörerna hos hund är maligna. Av dessa klassificeras 40-50 % som någon typ av karcinom, d.v.s. tumörer som utgår från epitelial vävnad. Cirka 5-10 % av maligna juvertumörer klassificeras som sarkom d.v.s. tumörer utgående från mesenkymal vävnad (t.ex. bindväv, fett, brosk, ben och muskler). Det finns även en mindre vanlig blandad form, så kallad karcinosarkom, med ursprung i både epitelvävnad och bindväv (Lana *et al.*, 2007).

Inflammatoriskt juverkarcinom (engelska: Inflammatory mammary carcinoma - IMC) är lågt differentierade och mycket maligna. De växer ofta invasivt i hud och lymfvävnad och metastaserar ofta. Tumörerna associeras med ödem och inflammation med infiltrat av både mononukleära och polynukleära celler (von Euler, 2011). IMC kan vara svåra att skilja från mastit både via klinisk och cytologisk undersökning (Henry, 2010).

RUTA 1. HISTOLOGISK KLASSIFICERING AV JUVERTUMÖRER HOS HUND

Maligna tumörer

- Icke infiltrerande (*in situ*-) karcinom
- Carcinoma complex
- Carcinoma simplex
 - Tubulopapillärt karcinom
 - Solitt karcinom
 - Anaplastiskt karcinom
- Speciella karcinomtyper
 - Spindelcellskarcinom
 - Plattepitelskarcinom
 - Muköst karcinom
 - Lipidrikt karcinom
- Sarkom
 - Fibrosarkom
 - Osteosarkom
 - Övriga sarkom
- Karcinosarkom
- Karcinom eller sarkom in benign tumör

Benigna tumörer

- Adenom
 - Adenoma simplex
 - Komplext adenom
 - Basaloidadenom
- Fibroadenom
 - Lågcellularitets-fibroadenom
 - Högcellularitets-fibroadenom
- Benign blandad tumör
- Gångpapillom

Från Misdorp *et al.*, 1999

Metastasering

Ca. 50 % av maligna juvertumörer hos hund metastaserar (Henry, 2010). Spridningen sker vanligen via blod eller lymfkärl och metastaser hittas främst i lymfknutor och lungor (von Euler, 2011).

Det mycket komplicerade dräneringssystemet hos hundens juverkörtlar ligger till grund för huruvida lymfatisk metastasering sker till antingen axillar- eller inguinallymfknutorna. Hunden har vanligen fem par juverkörtlar - två kraniala/thorakala par, två abdominala par samt ett kaudalt/inguinalt par – i två separerade rader. De thorakala körtlarna töms vanligen till axillarlymfknutorna och inguinalkörtlarna töms till inguinallymfknutorna medan de abdominala körtlarna kan tömmas till antingen axillar- eller inguinallymfknutorna (Henry, 2010). Lymfatisk kommunikation sker mellan den första, andra och tredje juverdelen samt mellan den fjärde och femte. Dessutom kan kommunikation finnas mellan den tredje och fjärde mammarkörteln (Sorenmo, 2003).

Klinisk bild och diagnos

Juvertumörer upptäcks ofta som bifynd vid rutinmässiga veterinärundersökningar eller av noggranna ägare. I över hälften av fallen hittas fler än en massa som uppstått antingen samtidigt eller efter varandra (Henry, 2010).

Tumörerna kan associeras med bröstvårtan eller, vilket är vanligare, själva körtelvävnaden. Varje juverkörtel kan drabbas av en eller flera benigna eller maligna tumörer. Hos individer med benigna tumörer är nybildningarna vanligen små, fasta och väl avgränsade från intilliggande vävnad. Kliniska tecken som tyder på malignitet är snabb tillväxt, svårdefinierade gränser, vidhäftning mot huden eller underliggande mjukdelsvävnader, samt ulceration eller inflammation (Lana *et al.*, 2007).

Diagnos fordrar histopatologisk undersökning av biopsier och det är viktigt att undersöka samtliga massor. Det är viktigt att komma ihåg att både benigna och maligna tumörer kan förekomma samtidigt och att ett enstaka prov inte behöver representera alla tumörer hos patienten vid det tillfället. Preoperativ cytologi av palperbara lymfknotor kan underlätta fastställandet av sjukdomens omfattning innan kirurgi. Oavsett preoperativ bedömning bör även lymfknotor avlägsnade i samband med kirurgisk behandling undersökas histopatologiskt (Henry, 2010).

Röntgen av thorax från tre perspektiv, i syfte att upptäcka eventuella lungmetastaser, är nödvändigt att utföra innan eventuell kirurgisk behandling då resultatet kan ha stor betydelse för utgången (Henry, 2010).

Staging

På grund av den stora andelen metastaser hos maligna juvertumörer erfordras fullständig tumör-staging. Vid staging utvärderas såväl primärtumören som regionala och avlägsna metastaser avseende makroskopiskt utseende (ulceration, vidhäftning till intilliggande vävnad, etc.). Det första staging-systemet utarbetades av World Health Organization (WHO) och sedan dess har ett nytt modifierat system presenterats (*Tabell 1*). Oavsett system krävs bedömning av regionala lymfknotor och eventuella avlägsna metastaser, framför allt i lymfknotor och lungor (Henry, 2010).

TABELL 1. MODIFIERAT STAGINGSYSTEM

T - Primär Tumörstorlek

T ₁	< 3 cm i diameter
T ₂	3-5 cm i diameter
T ₃	> 5 cm i diameter
T ₄	Inflammatoriskt karcinom

N - Status i regional lymfknuta (Node)

N ₀	Ingen metastas
N ₁	Metastas till ipsilateral lymfknuta
N ₂	Metastas till kontralateral lymfknuta

M - Distal Metastas

M ₀	Ingen metastas
M ₁	Distal metastas

Klinisk klassificering

I	T1, N0, M0
II	T0-1, N1, M0
III	T3, N0-N2, M0
IV	T1-T4, N0-N2, M0-M1

Från Henry, 2010

Det finns även ett histologiskt stagingsystem som baseras på hurvida tumörcellernas förekomst begränsas till eptielvävnad i körtelgångarna, om de invaderar stromat, blod- och/eller lymfkärl eller om de rent av hittas som systemiska metastaser (Tabell 2) (Henry, 2010).

TABELL 2. HISTOLOGISKT STAGINGSYSTEM

Stadium	Kännetecken	Frekvens av <i>De Novo</i> - eller återkommande juvertumörer två år efter kirurgi
0	Tumörcellerna är begränsade till gångvävnad	25 %
I	Tumörcellerna invaderar stromal vävnad	72 %
II	Vaskulär/lymfatisk invadering och/eller metastas till regional lymfknuta	95 %
III	Systemisk metastas	Ej rapporterat; hundar med Stadium III har per definition inga sjukdomsfria intervaller

Från Henry, 2010

Behandling

Behandlingen är kirurgisk och hur mycket juervävnad som skall avlägsnas beror på tumören/tumörernas omfattning och antal (Lana *et al.*, 2007).

Nodulektomi (lumpektomi) innebär att endast själva tumören avlägsnas tillsammans med ett tunt lager av omkringliggande vävnad. Detta kan vara indicerat för enstaka solitära tumörer mindre än 0,5 cm i diameter som är fasta i konsistensen och väl avgränsade till omkringliggande vävnad. Om patologianatomisk diagnos (PAD) visar att tumören är benign krävs inget ytterligare ingrepp, förutsatt att tumören är liten, välavgränsad och omgiven av 1-2 cm frisk vävnad i alla riktningar. Om tumören är ofullständigt avlägsnad eller avlägsnad med för liten marginal bör ett mer radikalt kirurgiskt ingrepp utföras (Lana *et al.*, 2007).

Regional mastektomi är ett relativt sett större ingrepp vars omfattning baseras på den drabbade juverkörtelns lymfatiska dränage. Drabbade juverkörtlar avlägsnas tillsammans med dränerande lymfknutor, de juverkörtlar som ligger nedströms i dräneringssystemet, samt tillfredsställande mängd av omgivande mjukdelsvävnad (Lana *et al.*, 2007).

Unilateral mastektomi utförs när ett flertal tumörer hittas längs juverraden. En unilateral mastektomi kan ta mindre tid och vara mindre traumatisk än multipla lumpektomier eller mastektomier. Bilateral mastektomi kan utföras när flera massor hittas i båda juverraderna. Tillslutning av huden kan emellertid vara mycket svårt om inte omöjligt och risken för försämrad livskvalitet och allvarliga postoperativa komplikationer är stor, varför upprepade unilaterala mastektomier rekommenderas (Fossum, 2002).

Kirurgisk behandling kan kompletteras med t.ex. strålning, cytostatika och hormonbehandling. Dessa behandlingsmetoder används inte rutinmässigt i Sverige och det finns få studier som visar att någon av dessa metoder i kombination med kirurgi ger ett bättre behandlingsresultat jämfört med enbart kirurgi (Henry, 2010).

Vid IMC anses kirurgisk behandling vara kontraindicerad, bland annat på grund av att risken för komplikationer i samband med behandling är stor (Lana *et al.*, 2007). Kirurgisk behandling tycks dessutom varken bota eller förlänga patientens liv (Fossum, 2002).

Prognos och överlevnad

Vetenskapligt fastställda prognostiska faktorer visas i tabell 3. Tumörens lokalisation, d.v.s. om den är belägen kranialt eller kaudalt i juverraden, verkar emellertid inte påverka prognosen (Sorenmo, 2003). Antalet tumörer, val av kirurgisk metod eller huruvida OHE utförs i samband med kirurgi eller inte har heller inte betydelse för prognosen. Det råder delade meningar om huruvida ålder vid diagnos samt ras utgör prognostiska faktorer (Lana *et al.*, 2007).

Sarkom och IMC associeras med den sämsta prognosen bland juvertumörer hos hund. Även blandade tumörer och plattepiteliskarcinom associeras med korta överlevnadstider (Henry, 2010).

TABELL 3. SAMMANFATTNING AV PROGNOTISKA FAKTORER HOS HUNDAR MED JUVERTUMÖRER

	Bra	Dåligt
Tumörstorlek	< 3 cm i diameter	> 3 cm i diameter
Tumörens makroskopiska utseende	Väl avgränsad	Invasiv, ulcererad
Lymfknuta	Negativ	Positiv
Uttryck av steroidreceptorer	Positiv	Negativ
Histologisk subtyp	Högt differentierade karcinom Carcinoma complex Tubulära/papillära karcinom	Lågt differentierade karcinom Carcinoma simplex Solida karcinom Anaplastiska karcinom Inflammatoriska karcinom Sarkom
Histologisk tumörgrad	I	III

Från Lana et al., 2007

Malignt lymfom hos hund

Förekomst, etiologi och riskfaktorer

Malignt lymfom är en varierad samling av lymfoida maligniteter som alla har sitt ursprung i fasta organ (d.v.s. lymfknutor, lever och mjälte), vilket skiljer dem från lymfoid leukemi som uppstår i benmärgen (Nelson & Couto, 2009 [b]; Vail & Young, 2007).

Malignt lymfom utgör ungefär 7-24 % av alla neoplasier hos hund (Vail & Young, 2007). De kan drabba hundar av alla åldrar, raser och båda könen. Incidensen ökar med stigande ålder (Bryan, 2010).

Etiologin till malignt lymfom hos hund är till stor del okänd och anses vara multifaktoriell då inget gemensamt etiologiskt agens kunnat fastställas (Nelson & Couto, 2009 [b]; Vail & Young, 2007). En genetisk komponent är uppenbar då neoplasierna är högt förekommande inom vissa hundraser och blodlinjer. Boxer, Basset hound, rottweiler, Cocker spaniel, Sankt Bernard, skotsk terrier, Airedaleterrier, engelsk bulldog och Golden retriever löper en relativt hög risk att utveckla malignt lymfom (Nelson & Couto, 2009 [b]).

Utvecklingen av malignt lymfom har associerats med exponering för ogräsmedlet 2,4-diklorfenoxiättiksyra, boende vid industrier och att djurägarna använder vissa kemikalier (t.ex. färger och lösningsmedel) (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010).

Försämrad immunfunktion har identifierats hos hundar med malignt lymfom (Vail & Young, 2007). Immunsystemförändringar hos hunden, t.ex. immunmedierad trombocytopeni, har associerats med en ökad risk för påföljande utveckling av malignt lymfom (Vail & Young, 2007). Immunosuppressiva mediciner som t.ex. cyklosporiner ökar risken hos människor och sannolikt även hos hund (Bryan, 2010).

Flertalet molekylära avvikelser har undersökts hos hundar med malignt lymfom. Bland annat har somatiska genetiska mutationer i tumörsuppressorgen p53 och proto-onkogenen N-ras rapporterats hos hundar med malignt lymfom (Vail & Young, 2007). Epigenetiska moduleringar, d.v.s. ärftliga men reversibla förändringar i DNA som är oberoende av förändringar i DNA:ts nukleotidsekvens, har också undersökts hos hundar med malignt lymfom. Hypometylering av cytosinbaserna i hundens kromosomer hittades i neoplastiska celler i de flesta fall av malignt lymfom och är involverat i den maligna transformeringen av lymfoida celler (Bryan, 2010; Vail & Young, 2007).

Klinisk bild och klassificering

Malignt lymfom kan hos hund vara både indolenta (*långsamväxande*) och aggressiva. De kan vara solitära eller multicentriska, lymfknotebaserade eller associeras med många organ i kroppen. Tidig, precis diagnos och noggrann staging är avgörande för att adekvata kliniska bedömningar ska kunna göras. Tumörstadium har visat sig vara prognostiskt och staging-test bör därför utföras rutinmässigt (Bryan, 2010).

Klassificeringen av malignt lymfom hos hund kan urskiljas baserat på anatomisk lokalisation, histologiska kriterier och immunofenotypiska karaktärsdrag (d.v.s. B- eller T-celler). De vanligaste anatomiska formerna av malignt lymfom är, med sjunkande prevalens, multicentriska, mediastinala, alimentära och kutana former. Primärt extranodala former, som kan påträffas på vilka platser som helst utanför lymfsystemet, inkluderar ögon, centrala nervsystemet (CNS), ben, testiklar, urinblåsa, hjärta och näshåla (Vail & Young, 2007). De kliniska fynden beror på vilken anatomisk form som presenteras (Nelson & Couto, 2009 [b]).

80 % av alla hundar med malignt lymfom utvecklar den multicentriska formen som utmärks av lymfadenopati av ytliga lymfknotor. De förstörade lymfknotorna är vanligen smärtfria, gummiaktiga och distinkta. Drabbade hundar är oftast asymptomatiska men kan även presenteras med en historia av viktninskning, letargi, anorexi och febrila episoder (Vail & Young, 2007). Sjukdomen tycks uppstå i en eller flera lymfknotor för att sedan progrediera till att involvera ett stort antal lymfknotor, lymfoid vävnad och till och med icke-lymfoid vävnad (Bryan, 2010). Diffus lunginvolvering kan upptäckas vid röntgenundersökning. Hepatomegali, splenomegali eller extranodala lesioner (t.ex. okulära, kutana, renala eller neurala) kan också förekomma (Nelson & Couto, 2009 [b]).

Den mediastinala formen av malignt lymfom utgör runt 5 % av fallen. Denna form karaktäriseras av förstoring av de kranio mediastinala lymfknotorna, eller thymus, eller båda (Vail & Young, 2007). Hundarna söker ofta på grund av plötsligt uppkommen dyspné, hosta eller regurgitation. Symptomen från respirationsorganen och övre digestionstrakten orsakas av kompression orsakad av de förstörade kraniala mediastinallymfknotorna, och ibland kan även pleural effusion (*vätska i lungsäcken/hydrothorax*) bidra. Vanliga fynd vid auskultation av bröstkorgen är dämpade respiratoriska ljud, lungljud förskjutna till den dorsokaudala delen av thorax samt dämpade hjärtljud (Nelson & Couto, 2009 [b]). Den mediastinala formen är den lymfom-form som oftast associeras med hyperkalcemi och hos dessa patienter är polyuri och

polydipsi vanliga fynd (Vail & Young, 2007; Nelson & Couto, 2009 [b]). Humoral hyperkalcemi är det enda paraneoplastiska syndromet hos hundar med malignt lymfom som har klinisk betydelse och är vanligast i samband med lymfom av T-cellsfenotyp (Nelson & Couto, 2009 [b]). Mediastinala lymfom är nästan alltid av T-cellsfenotyp (Vail & Young, 2007).

Alimentära lymfom utgör också de runt 5 % av lymfomfallen (Vail & Young, 2007). Kräkning, anorexi, diarré och viktninskning är vanliga kliniska fynd i samband med alimentärt lymfom (Nelson & Couto, 2009 [b]). Blodprovsundersökning visar ofta hypoproteinemi som har visat sig vara en negativ prognostisk faktor (Vail & Young, 2007; Bryan, 2010). Primära gastrointestinala lymfom är vanligen diffust eller multifokalt utbredda i tunntarmen, ofta med omfattande ytlig ulceration och ibland transmural infiltration av serosan (Vail & Young, 2007). Intraabdominal lymfadenopati kan, men behöver inte, föreligga (Nelson & Couto, 2009 [b]). Vid klinisk undersökning hittas därför ofta förtjockade tarmslyngor (hos patienter med diffust tunntarmslymfom) alternativt en eller flera intraabdominella massor (d.v.s. förstörade lymfknutor eller intestinala massor) (Nelson & Couto, 2009 [b]). Det är viktigt att histologiskt skilja alimentärt lymfom från lymfocytisk-plasmacytisk enterit (LPE), vilket dock kan vara svårt. Det faktum att lymfomen invaderar tarmens muscularislager skiljer dem från lymfocytär enterit. Det föreslås ibland att LPE är ett förstadium till alimentärt lymfom. Alimentärt lymfom har tidigare ansetts ha sitt immunofenotypiska ursprung i ffa B-celler. Nya studier antyder dock att de flesta alimentära lymfom hos hund har sitt ursprung i T-celler (Vail & Young, 2007).

Kutana lymfom kan vara solitära eller mer generaliserade och klassificeras vanligen som epiteliotropiska (mycosis fungoides) eller non-epiteliotropiska. Kutana lymfom kan även involvera munslemhinnan och extrakutan involvering (oftast i lymfknutor, lever, mjälte och benmärg) förekommer också. Epiteliotropa kutana lymfom är de vanligaste av de kutana lymfomen hos hund och härstammar vanligen från T-celler (Vail & Young, 2007). De kliniska fynden och lesionernas utseende är extremt varierande och kan imitera andra primära eller sekundära hudlesioner (Nelson & Couto, 2009 [b]).

Diagnos och staging

Kliniska tecken och fynd vid klinisk undersökning fungerar vanligen som indikation på malignt lymfom. Före det att behandling sätts in måste diagnosen dock konfirmeras cytologiskt, histopatologiskt eller molekylärt. Vidare krävs en panel bestående av åtminstone blodstatus, biokemisk profil och urinanalys. Panelen kan erbjuda värdefull information som kan hjälpa djurägaren och klinikern att bestämma huruvida behandlings ska sättas in eller inte. Kliniska abnormaliteter hos patienten är i hög grad avgörande för vilka läkemedel som ska administreras då läkemedlen ofta har allvarliga bieffekter och därför kan vara direkt kontraindicerade hos vissa patienter (Nelson & Couto, 2009 [b]).

Utvärdering av bröst- och bukhåla kan vara viktigt för att bestämma omfattningen av cancers involvering av inre vävnader. Med thoraxröntgen kan lunginfiltrat (hittas i 1/3 av fallen), lymfadenopati i sternal- och tracheobronchiallymfknotorna (2/3 av fallen) och andra

mediastinala massor upptäckas. Ultraljud och röntgen kan identifiera abnormaliteter i bukhålan - t.ex. avslöjas på detta sätt involvering i sublumbär- och mesenteriallymfknotorna, mjälte och lever i 50 % av fallen. Avancerad bilddiagnostiska tekniker såsom datortomografi (DT), magnetisk resonanstomografi (MRI) och positronemissionstomografi (PET) blir dessutom allt vanligare inom veterinärmedicinen (Nelson & Couto, 2009 [b]).

Cytologisk undersökning av prov uttagna med hjälp av finnålsaspirat (FNA) av perifera lymfknotor erbjuder snabb identifiering av monomorfa, onormala lymfocytpopulationer, men ger inte en fullständig klassificering och graderingsinformation. Histopatologisk undersökning av kirurgiskt exciderade lymfknotor tillåter fullständig klassificering och gradering samt immunofenotypning av sjukdomen vilket ger värdefull prognostisk information (Bryan, 2010).

Efter att en lymfomdiagnos konfirmerats utför man vanligen en staging av sjukdomen för att kunna bedöma prognos. Ett histologiskt staging-system utarbetat av WHO har under de senaste två decennierna använts för hund (*Tabell 4*). I detta system används klinisk och klinikopatologisk information från patienterna för att försöka bestämma sjukdomens omfattning och korrelera det med prognosen. WHO-systemet är dock inte prognostiskt i sig (t.ex. är överlevnaden likartad hos patienter med grad I- och grad IV-lymfom) (Nelson & Couto, 2009 [b]). Förutom WHO-systemet tillämpas bland annat National Cancer Institutes (NCI) of Health Working Formulation och Kiel-systemet. Båda systemen utvärderar arkitektur och cellulär morfologi men liksom WHO-systemet inkluderar inte NCI-systemet immunofenotyp vid klassificeringen (Bryan, 2010).

TABELL 4. STAGINGSYSTEM ENLIGT WORLD HEALTH ORGANIZATION

Stadium	Kliniska kännetecken
I	Involvering av en solitär lymfknuta
II	Fler än en lymfknuta är förstörade men på samma sida av diafragma
III	Generell lymfknuteinvolvering
IV	Stadium III-fynd, plus hepatomegali och/eller splenomegali
V	Något av ovanstående, plus involvering av benmärg eller extranodala strukturer
	-substadium a: asymptomatisk
	-substadium b: sjuk

Från Nelson & Couto, 2009 [b]

Histologiskt kan malignt lymfom graderas som antingen låg- (små lymfocytiska eller centrocytiska lymfom) eller intermediära till höga (diffusa stora celler, centroblastiska och immunoblastiska lymfom) vilket har stor betydelse för klinisk hantering av fallet. Fastställandet av tumörens histologiska grad kombinerat med bestämmandet av dess immunofenotyp ger användbar information för klinikern vid val av behandling. Andelen patienter som visar ett bra svar vid kemoterapi är bättre hos djur med B-cellslymfom och lymfom av intermediär till hög histologisk grad (Vail & Young, 2007). Låggradiga lymfom associeras med en signifikant bättre överlevnadsprognos jämfört med intermediära och höggradiga lymfom (Bryan, 2010).

En noggrann utvärdering av patienten möjliggör identifiering av prognostiska faktorer som kan påverka djurägarens beslut om behandling och klinikerns val av kemoterapi för att minimera läkemedlens toxiska effekter (Bryan, 2010).

Behandling

Så snart en diagnos har fastställts ska prognos och potentiella terapeutiska alternativ diskuteras med djurägaren (Nelson & Couto, 2009 [b]). Faktorer att ta hänsyn till inkluderar sjukdomens stadium, närvaron eller frånvaro av paraneoplastiska fenomen, patientens generella fysiologiska status, ekonomisk och tidsmässigt engagemang hos djurägaren samt patientens välbefinnande avseende sannolikhet för behandlingsrelaterade bieffekter (Vail & Young, 2007). Malignt lymfom är vanligen en systemisk sjukdom som antas vara metastaserande vid upptäckt. Lokaliserade lymfom har rapporterats, men systemisk terapi krävs nästan alltid för tillräcklig effekt (Nelson). Systemisk kemoterapi är förstahandsval vid behandling av malignt lymfom hos hund, och generellt sett används kombinationsprotokoll. Genom att använda kombinationer av läkemedel med olika verkningsmekanismer slår man ofta ut en större del av patientens tumörbörda jämfört med om man skulle ha använt en enda farmakologisk substans (*monoterapi*). Med kombinationsterapi kan också graden av bieffekter minimeras (Vail & Young, 2007).

Det finns två huvudsakliga kemoterapeutiska tillvägagångssätt för hundar med malignt lymfom: behandlingsprotokoll som baseras på antingen COP (cyklofosfamid, vinkristin, och prednison) eller CHOP (cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin och prednison). De COP-baserade protokollen är vanligen mindre aggressiva men måste fortgå under resten av patientens liv. Förenklat utgörs de av en inledande fas med induktionskemoterapi, följt av en underhållsfas och slutligen reinduktion vid eventuellt återfall. Under de två senaste decennierna har ett stort antal artiklar om CHOP-baserade protokoll dykt upp. En stor fördel med användande av CHOP-baserade protokoll är att patienterna behandlas under en begränsad tidsperiod, d.v.s. de saknar underhållsfas. Denna aspekt är central vid behandling av cancer inom humanmedicinen där patienterna ser fram emot ett liv utan kemoterapi (Nelson & Couto, 2009 [b]).

För att minimera kemoterapins toxiska effekter tillämpas inom svensk veterinärmedicin ett palliativt tillvägagångssätt snarare än ett terapeutiskt, d.v.s. målet är att slå ut en stor majoritet av tumörcellerna snarare än att utrota samtliga av dem. I praktiken innebär det administrering av lägre doser kemoterapeutika jämfört med inom humanmedicinen. Patienterna vid Universitetsdjursjukhuset (UDS) i Uppsala behandlas med ADRIA-Plus-protokollet som utarbetats i Utrecht, Holland (tabell 5) (von Euler, 2011 [online]). ADRIA-Plus-protokollet är ett CHOP-baserat cytostatikaprotokoll som är tidsbegränsat till fyra månader (Piek *et al.*, 1999; von Euler, 2011 [online]). De ingående substanserna är l-aspariginas, doxorubicin, chlorambucil, cyclofosfamid, prednisolon och dexametason (Piek *et al.*, 1999).

TABELL 5. ADRIA-PLUS-PROTOKOLL TILLÄMPAT VID UNIVERSITETSDJURSKLINIKEN, UPPSALA

Vecka	Dag	Medicin	Behandling ges
1	1	L-asparaginas Medac (<i>L-asparaginas</i>) 10 000 IU/m ²	På klinik
2	8	Adriamycin (<i>Doxorubicin</i>) (30 mg/m ²)	På klinik
		Dexadreson (<i>Dexametason</i>) (10 mg/m ²)	Hemma (tabletter)
4	22	Adriamycin (30 mg/m ²) (Kontrollera leukocyter plus hematologi!)	På klinik
		Leukeran (<i>Chlorambucil</i>) (25 mg/m ² , fördelat på 2 dagar)	Hemma (tabletter)
	23	Prednisolon (50 mg/m ² en g dagligen per vecka, minska med ¼ av dosen varje vecka)	Hemma (tabletter)
	33/34	Leukeran (25 mg/m ² , fördelat på 2 dagar)	Hemma (tabletter)
7	43	Adriamycin (30 mg/m ²)	På klinik
9	57	L-asparaginas Medac 10 000 IU/m ²	Hemma (tabletter)
	60	Sendoxan (<i>Cyklofosamid</i>) (200-250 mg/m ²)	Hemma (tabletter)
11	71	Adriamycin (30 mg/m ²)	På klinik
	80/82	Leukeran (25 mg/m ² , fördelat på 2 dagar)	Hemma (tabletter)
14	92	Adriamycin (30 mg/m ²)	På klinik
17	113	Sendoxan (200-250 mg/m ²)	Hemma (tabletter)
19	127	Utvärdering. Om i CR: AVBRYT behandlingen, Återbesök vid vecka 24/27/30/39/ 52	På klinik

CR= "complete remission", Kliniskt frisk.

Maropitant (Cerenia[®]) ges i fyra dagar efter varje adriamycinbehandling.

Från von Euler, 2011 [online]

Kirurgi, radioterapi, eller båda, kan användas för att behandla lokaliserade lymfom före och under kemoterapibehandling (Nelson & Couto, 2009 [b]).

Många djurägare kan p.g.a. t.ex. ekonomiska skäl eller tidsaspekter inte låta sin hund genomgå en fullständig cytostatikabehandling. Hos hundar som egentligen skulle kunna dra nytta av kemoterapeutisk behandling kan istället andra preparat, t.ex. enbart prednisolon, bidra till en förlängd period av god livskvalitet, ibland med upp till flera månader. Kandidater för sådan terapi är patienter med få eller inga kliniska symptom (Nelson & Couto, 2009 [b]).

Prognos och överlevnad

Bland hundar som behandlas med konventionella kemoterapiprotokoll för malignt lymfom varierar andelen patienter som genomgår remission mellan 80 och 90 procent. De flesta patienterna förväntas överleva mellan 12-16 månader, i jämförelse med en ungefärlig överlevnadstid på 4-8 veckor hos obehandlade patienter (Nelson & Couto, 2009 [b]). Andelen patienter som hamnar i remission och längden på terapins effektens varierar dock med närvaron eller frånvaron av prognostiska faktorer hos patienten (Vail & Young, 2007).

Thymidinkinas som diagnostiskt hjälpmedel vid cancer hos människa och hund

Överdriven och okontrollerad proliferation är ett av karaktärsdragen för cancer. Markörer för proliferation har därför visat sig vara användbara för att kunna ställa diagnos, uttala sig om prognos, välja behandling och för att upptäcka eventuella återfall i samband med tumörsjukdom. För att uppnå dessa syften har man inom humanmedicinen relativt länge använt sig av olika biomarkörer som hjälpmedel. Under senare år har ämnet fått ökat intresse även inom veterinärmedicinen och forskning bedrivs nu runt flera olika typer av markörer.

En av mycket få tumörmarkörer som har visat sig vara användbara och pålitliga för att ställa diagnos, uttala sig om prognos, välja behandling och upptäcka ev. återfall i samband med tumörsjukdomar är enzymet thymidinkinas (TK). TK:s fysiologiska roll är att katalysera fosforyleringen av nukleosiderna thymidin, deoxyuridin och deras analoger, med ATP som fosfatdonator. Produkten, olika nukleotider, fosforyleras vidare till dTDP och dTTP av vilka den senare fungerar som DNA-prekursor (von Euler *et al.*, 2010). Särskilt i snabbt prolifererande celler utgör enzymet en alternativ metabolisk väg för DNA-syntes (Nakamura *et al.*, 1997). Thymidinkinas hittas i princip hos alla däggdjur (Arner & Eriksson, 1995).

Det finns två olika former av thymidinkinas. Den ena, TK1, hittas i cellernas cytoplasma och är cellcykelberoende. I normala celler är TK1 endast aktivt under korta perioder under den tidiga S-fasen. I onormala celler förekommer emellertid enzymet i betydligt högre nivåer och aktiviten kvarstår i det senare fallet under hela S-fasen. Den andra formen av thymidinkinas, TK2, hittas i mitokondrierna och uttrycks i alla celler oavsett stadium i cellcykeln (von Euler *et al.*, 2005). TK2 har en mycket bredare substratspecificitet än TK1, som inkluderar deoxycytidin och många pyrimidinanaloger (Eriksson *et al.*, 2002).

TK1 har visat sig vara tätt korrelerat till andelen S-fasceller och därmed den generella proliferationsnivån. Av denna anledning har enzymet och dess aktivitet använts som en pålitlig och känslig markör för cellproliferation (von Euler *et al.*, 2005).

Mätning av TK1-koncentrationen

Koncentrationen av TK1 i serum går att mäta tack vare att man nyligen kunnat producera antikroppar specifikt riktade mot enzymet. Antikropparna känner igen TK1, inte bara i serum och cellutstryk, utan även i fixerade cellsnitt med hjälp av immunohistokemi. De mest specifika och sensitiva anti-TK-antikropparna riktas mot proteinets C-terminal (von Euler *et al.*, 2010). Hos människa har koncentrationen av TK1 i serum visat sig vara en viktig prognostisk faktor vid ett större antal maligniteter än TK1-aktiviteten. (He *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2003).

Ett problem med antikroppsbaseade analyser är emellertid att sensitiviteten hos dem är relativt låg. TK1-koncentrationerna hos normala patienter och patienter med tumörsjukdom i tidigt stadium är sällan tillräckligt höga för att detekteras med hjälp av befintliga metoder. Analyser som baseras på enzymaktivitet har en relativt hög sensitivitet då signalen amplifieras

under den enzymatiska reaktionen (He *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Voeller *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

TK1 uppvisar hög homologi mellan människa och hund. Enzymerna skiljer sig emellertid strukturellt sett åt i C-terminalen. Av denna anledning känner antikropparna riktade mot den humana C-terminalen inte känner igen hundens TK1 (von Euler *et al.*, 2010).

Resultat från humanmedicinska analyser av TK1-koncentrationen vid fasta tumörer är oklara, då signifikant skillnad i TK1-nivåer mellan friska kontroller och patienter med fasta tumörer inte alltid går att påvisa. Detsamma gäller för motsvarande veterinärmedicinska studier utförda på hundar (von Euler *et al.*, 2010).

Mätning av TK1-aktiviteten

Inom humanmedicinen används idag mätningar av TK1-aktiviteten för att bedöma prognos och behandlingar av ett antal hematologiska cancersjukdomar, bland annat leukemi, multipelt myelom, Hodgkin's lymfom och non-Hodgkin's lymfom (Nakamura *et al.*, 1997). TK1-aktiviteten har även visat sig värdefull i samband med solida tumörer såsom bröstcancer, colo-rektal cancer, lungcancer och äggstockscancer. Här har det använts för fastställande av sjukdomsstadium och prognos samt för att upptäcka återfall innan tumören blir kliniskt uppenbar (von Euler *et al.*, 2010).

Inom veterinärmedicinen används aktivitetsmätningar av TK1 i serum för att fastställa sjukdomsstadium och prognos för patienter med malignt lymfom. Forskning har visat att aktiviteten av TK1 i serum ökar i relation till tumörernas malignitet. Det har observerats att aktiviteten hos TK1 snabbt går ner till basala nivåer vid lyckade cancerbehandlingar. Det har också visats att en stegring av TK1-aktiviteten i serum ofta med flera veckor föregår kliniska symptom vid återfall av cancer (von Euler *et al.*, 2010).

För att påvisa och mäta aktivitet av TK1 i serum används ofta en thymidinalog. Så är fallet vid bland annat TK radioenzymatic assay (TK-REA) och Liaison TK assay som är en ELISA-baserad metod (von Euler *et al.*, 2010). Både TK-REA och Liaison TK assay är oberoende av art då båda metoderna uppmäter enzymaktiviteten, d.v.s. den fosforylerade produkten som aktivt TK1 producerar (von Euler *et al.*, 2006).

TK-REA bygger på en radioenzymatisk teknik i vilken TK1 fosforylerar den radioaktiva substratanalogen ¹²⁵I-iododeoxyuridin. Därefter mäts mängden reaktionsprodukt per tidsenhet vilken korrelerar med TK1-aktiviteten i serum. Metoden finns tillgänglig som ett kommersiellt testkit (Diasorin AB). TK-REA har använts under flera decennier och är i nuläget *Gold standard*-metod för tumörprognos och för att förutspå återfall inom humanmedicinen och mer nyligen även hos hundar med malignt lymfom (von Euler *et al.*, 2004). Ur veterinärmedicinsk synvinkel är analysens praktiska tillämpbarhet begränsad då den dels är dyr och dels medför riskfylld hantering av radioaktiva ämnen (von Euler *et al.*, 2010). Den radioaktiva isotopen ¹²⁵I emitterar gammastrålar med högt energiinnehåll som har hög penetrans i biologiska vävnader vilket gör hantering av isotopen besvärlig (Eriksson,

2011). Ytterligare en nackdel med TK-REA är att den förutom att mäta TK1-aktivitet delvis även uppmäter TK2-aktivitet. Detta faktum begränsar dock inte testets specificitet nämnvärt vid mätningar i serum tack vare att TK1 här utgör den dominerande formen (von Euler *et al.*, 2005). Vid analys av TK1-aktiviteten i cellextrakt ökar emellertid risken för falskt positiva resultat (von Euler *et al.*, 2010).

Liaison TK assay är en icke-radiometrisk analys för mätning av TK1-aktivitet i serum i vilket man använder det specifika, onaturligt substratet azidothymidin (AZT). TK1 i patientprovet katalyserar först fosforyleringen av AZT till motsvarande monofosfat, AZTMP. Som ett andra steg tillsätts specifika primära anti-AZTMP-antikroppar och AZTMP-märkt peroxidase till en mikrotiterplatta coatad med ett överskott av sekundära antikroppar riktade mot de primära anti-AZTMP-antikropparna. Konkurrens mellan AZTMP och AZTMP-märkt peroxidase uppstår och bundna antikroppskomplex binds upp av sekundära antikroppar. Därefter tvättas obundet AZTMP-märkt peroxidase bort medan det bundna peroxidaset detekteras och relateras till AZTMP-nivåerna, vilket ger TK1-aktiviteten i originalprovet (Öhrvik *et al.*, 2004).

I två studier av von Euler *et al.* validerades för första gången Liaison TK assay experimentellt mot TK-REA hos hundar, för att senare användas i en större klinisk studie, återigen med TK-REA som referens. Båda studierna visade att Liaison TK assay visade hög korrelation med TK-REA. Det kunde fastställas att hundar som behandlades mot malignt lymfom och därefter inte drabbades av återfall hade ett TK1-värde motsvarande det normala referensvärdet. TK1-nivåerna hos patienter med leukemi nådde signifikant lägre nivåer jämfört med hundar med återfall, även om de aldrig nådde ner till normala referensnivåer (patienter med leukemi är mycket svåra att behandla till den grad att tumörbördan helt försvinner). Hundar som drabbades av återfall hade vid båda tumörtyperna en signifikant förhöjd TK1-nivå (von Euler *et al.*, 2006; von Euler *et al.*, 2008; von Euler *et al.*, 2010).

En fördel med Liaison TK assay är att korsreaktionen med TK2 praktiskt taget är försumbar (von Euler, 2006), vilket kan ha betydelse vid analys av cellextrakt. Studier på TK1-aktivitet i fast tumörvävnad har hittills utvärderats i liten utsträckning både inom human- och veterinärmedicin, trots bevis som indikerar att TK1-tumöraktiviteten korrelerar med malignitetsgraden och terapivaret. Hos både människa och hund inducerar fasta tumörer generellt sett ett betydligt mindre svar i form av enzymaktivitet och är således svåra att skilja från normala kontroller (von Euler *et al.*, 2010).

Trots att Liaison TK assay uppvisar flera fördelar gentemot TK-REA har även den förra sina svagheter. I likhet med TK-REA är den praktiska tillämpbarheten hos Liaison TK assay ur veterinärmedicinsk synvinkel begränsad då metoden kräver en kostsam analysapparat (LIAISON®) från DiaSorin AB.

I denna studie presenteras en enkel och sensitiv metod för att mäta TK-aktiviteten i serum hos hundar med olika tumörtyper genom att använda det naturliga substratet för TK1 d.v.s. thymidin (dTHd), inmärkt med radioaktivt tritium, i kinetiskt definierade förhållanden. Metoden beskrevs först av Ellims *et al.*, 1981 och förfinas vid professor Staffan Erikssons

grupp på Biomedicinskt centrum, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi på Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala. Radioaktivt tritium är till skillnad från ^{125}I en lågenergetisk isotop med vilken man kan handskas på ett betydligt enklare sätt. Dessutom är halveringstiden för tritium längre än den för ^{125}I och därmed stabilt under en längre tid. Således är $[3\text{H}]\text{-dThd}$ -analysen både säkrare och mer ekonomisk jämfört med TK-REA (Eriksson, 2011).

I studien ska serum från hundar med juvertumörer och hundar med malignt lymfom analyseras med hjälp av den nya metoden avseende TK1-aktivitet. Värdena ska därefter jämföras med friska kontroller för att undersöka huruvida det föreligger signifikant skillnad i aktivitetsnivåerna mellan sjuka och normala individer. Vidare kommer värden på TK1-aktiviteten i serum från hundar med malignt lymfom även erhållas med hjälp av Gold standard-metoden TK-REA. Vi ska följaktligen jämföra aktivitetsvärden erhållna med hjälp av den nya metoden med värden från TK-REA-metoden och därmed undersöka huruvida de nya mätningarna har relevans jämfört med tidigare Gold standard. I studien skall även ingå att följa TK-aktiviteten i serum hos patienter med malignt lymfom under kemoterapi, liksom att korrelera TK1-aktiviteten med sjukdomsstadium.

MATERIAL OCH METODER

Material

Blodprov samlades in från 98 hundar (50 hanar, 45 honor och 3 kastrerade) och serumet lagrades i portioner i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fram till analys. Serumprover samlades in vid Universitetsdjursjukhuset (UDS), institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala och projektet har fått godkännande av Sveriges djuretiska kommitté samt dispens från SJV att använda icke-destinationsuppfödda djur i forskning. Histopatologisk konfirmation av diagnos uppbringades hos alla tumörer. Varje tumör stagades enligt WHO:s klassificeringsscheman. De diagnostiska metoder som användes varierade beroende på tumörernas histologiska typ, anatomiska lokalisation samt hundens kliniska status. Dessa innefattade, men var inte begränsade till, klinisk undersökning, hematologiprofil, biokemiska serumanalyser, urinanalyser och radiologiska studier.

Medelåldern hos hundarna som inkluderades i studien var 6,7 år med en variation på 1,1 till 14,1 år. Subjekten var 40 normala hundar (14 hanar och 26 honor), 25 hundar med malignt lymfom (14 hanar, 7 honor och 4 kastrater) och 3 hundar med juvertumörer (2 honor och 1 kastrat). Medelåldern hos den friska gruppen var 5 år med en variation på 1,1 till 12 år. Medelåldern hos hundarna med malignt lymfom var 8 år med en variation på 4,2 till 14,1 år. Medelåldern hos hundarna med juvertumörer var 8,9 år med en variation på 6 till 12 år.

32 hundraser inkluderades i studien. De vanligaste raserna var Golden retriever och blandras (7/68 för båda) följt av Flat coated retriever (6/68) och därefter Labrador retriever, Schäfer och Riesenschnauzer (5/68) för varje. Bland hundar med malignt lymfom var Golden retriever den vanligaste rasen (5/25) följt av blandras (3/25). Endast tre individer med juvertumörer inkluderades i studien (en var av raserna Rottweiler, Engelsk springer spaniel och Collie).

Hundar med malignt lymfom behandlades med ADRIA-Plus-protokollet och serumprover togs från samma individ vid olika tidpunkter efter kemoterapi.

Aktiviteten hos TK1 var hos vissa serumprover först uppmätta med TK-REA och värdena uttrycks som enheter per liter (U/L).

Radiomärkt thymidin [metyl-³H]-dThd (20 Cimpl) inhandlades från PerkinElmer.

Thymidinkinasanalys

TK1-aktivitet mättes med radiokemisk analys med hjälp av *DE-81-filterpapperteknik*. I korthet innehöll reaktionsblandningen 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 μM substrat och 10 μl serum i en slutvolym på 40 μl. Serumet inkuberades under en timme i 37 °C. Två portioner av reaktionsblandningen sattes till DE-81filterpapprena (1 cm, Whatman) och torkades. Filtrena tvättades med 1 mM ammoniumformat i 5 minuter två gånger och produkterna späddes under 45 minuter i 0,1 M HCl och 0,2 M KCl. Slutligen uppmättes radioaktiviteten genom *β-scintillation liquid counting* och aktiviteten uttrycktes som pmol/min/ml.

Statistisk analys

För statistisk analys användes Microsoft Excel Analysis ToolPak.

RESULTAT

Analysoptimering

Radiokemisk analys med användning av tritiummärkt thymidin ([³H]-dThd) som substrat används rutinmässigt för att bestämma TK-aktivitet i celleextrakt eller för att rena enzymer. Här har vi optimerat denna metod för att mäta TK1-aktivitet i serum och jämfört denna metod med det kommersiellt tillgängliga kit för att mäta TK1-aktivitet i serum.

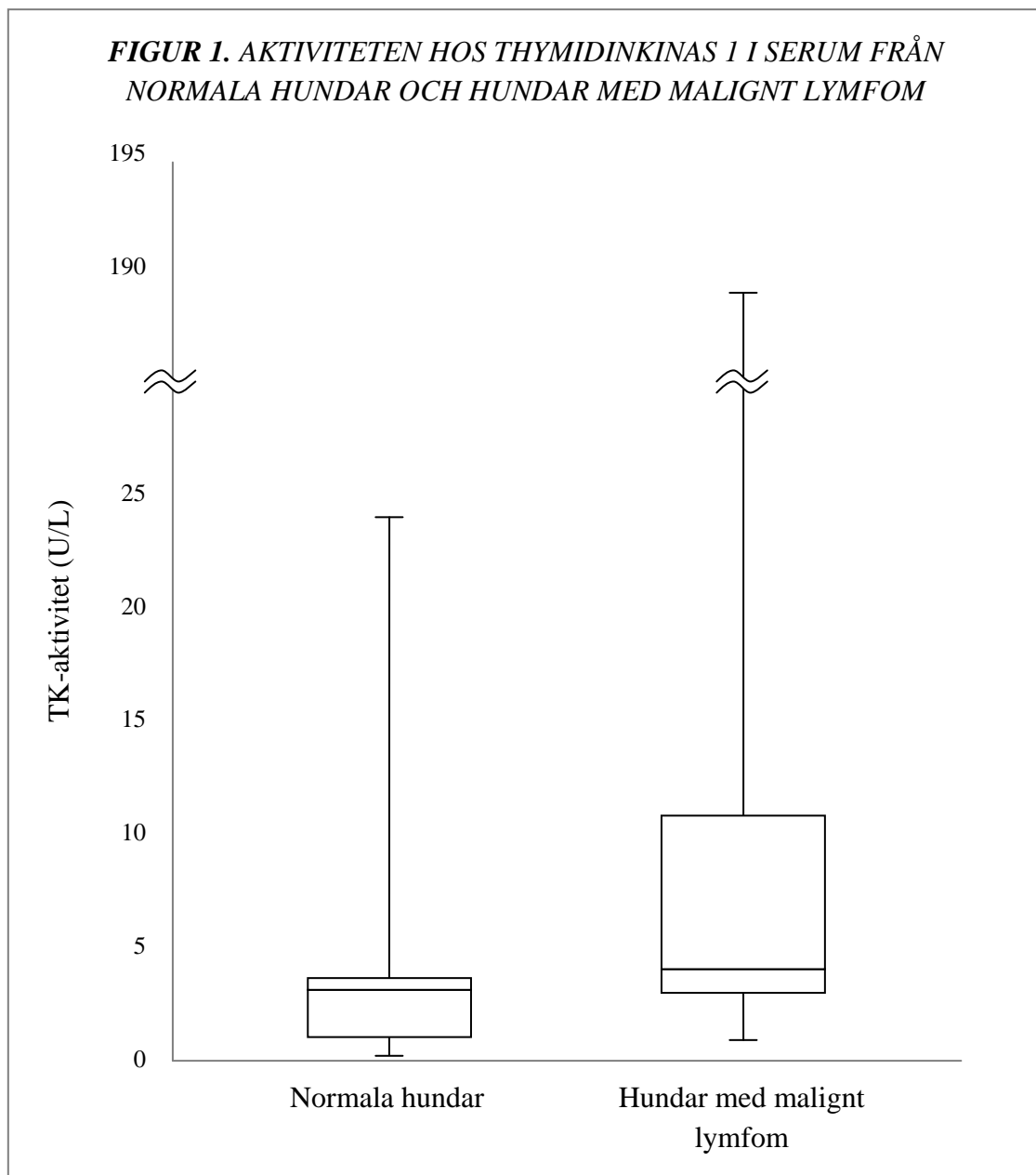
TK-aktivitet i serum hos normala och sjuka hundar

Serumprover samlades in från 40 friska hundar av olika raser och TK1-aktiviteten bestämdes. Som visas i Tabell 6 varierade TK1-aktiviteten i serum hos normala hundar från 0,3 till 6,0 U/L vid mätning m.h.a. [³H]-dThd-analysen. Det fanns en skillnad mellan i TK-aktivitet i serum mellan olika raser, t.ex. hade schäfer och beagle högre TK1-aktivitet än andra raser. Medelvärde av TK-värden i serum från normala hundar var 2,7 U/L.

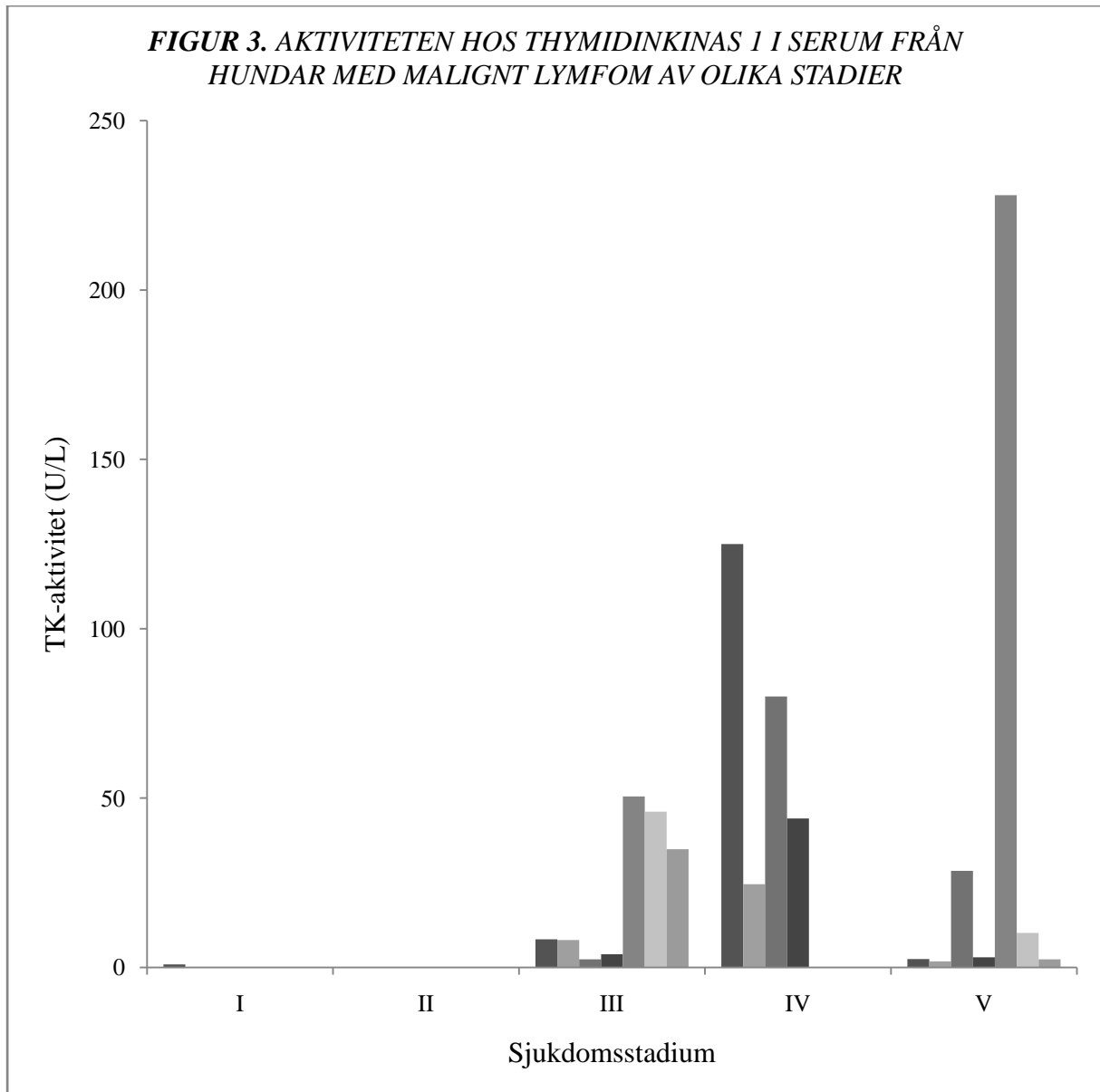
Även TK-aktiviteten i serumprover insamlade från hundar med malignt lymfom analyserades. Vissa av dessa prover analyserades med både [³H]-dThd-analysen och med TK-REA-analysen (Tabell 7). Medelvärde för TK1-aktivitet hos hundar med malignt lymfom innan behandling inletts var 37,1 U/L med en variation på mellan 0,9 och 80 U/L. Statistisk analys visade att TK1-aktiviteten i serum var signifikant högre hos hundar med malignt lymfom (p = 0,016) jämfört med den friska gruppen (Figur 1).

Av hundarna med malignt lymfom genomgick 19 stycken (tabell 8) staging enligt WHO-systemet (stadium I: 1 hund; stadium III: 7 hundar; stadium IV: 4 hundar; stadium V: 7 hundar). I figur 2 visas TK1-aktiviteten i serum från patienter med olika stadier av malignt lymfom. Ingen signifikant skillnad kunde påvisas avseende TK1-aktiviteter i serum mellan de olika sjukdomsstadierna. Emellertid observerades de högsta aktiviteterna hos patienter i stadium 4 och 5.

TK1-aktiviteten i serumprover från hundar med juvertumörer analyserades enbart med [³H]-dThd-analysen (Tabell 9). Serumproverna från de tre provtagna individerna visade alla en TK1-aktivitet under medelvärdet för den friska gruppen (2,7 U/L).



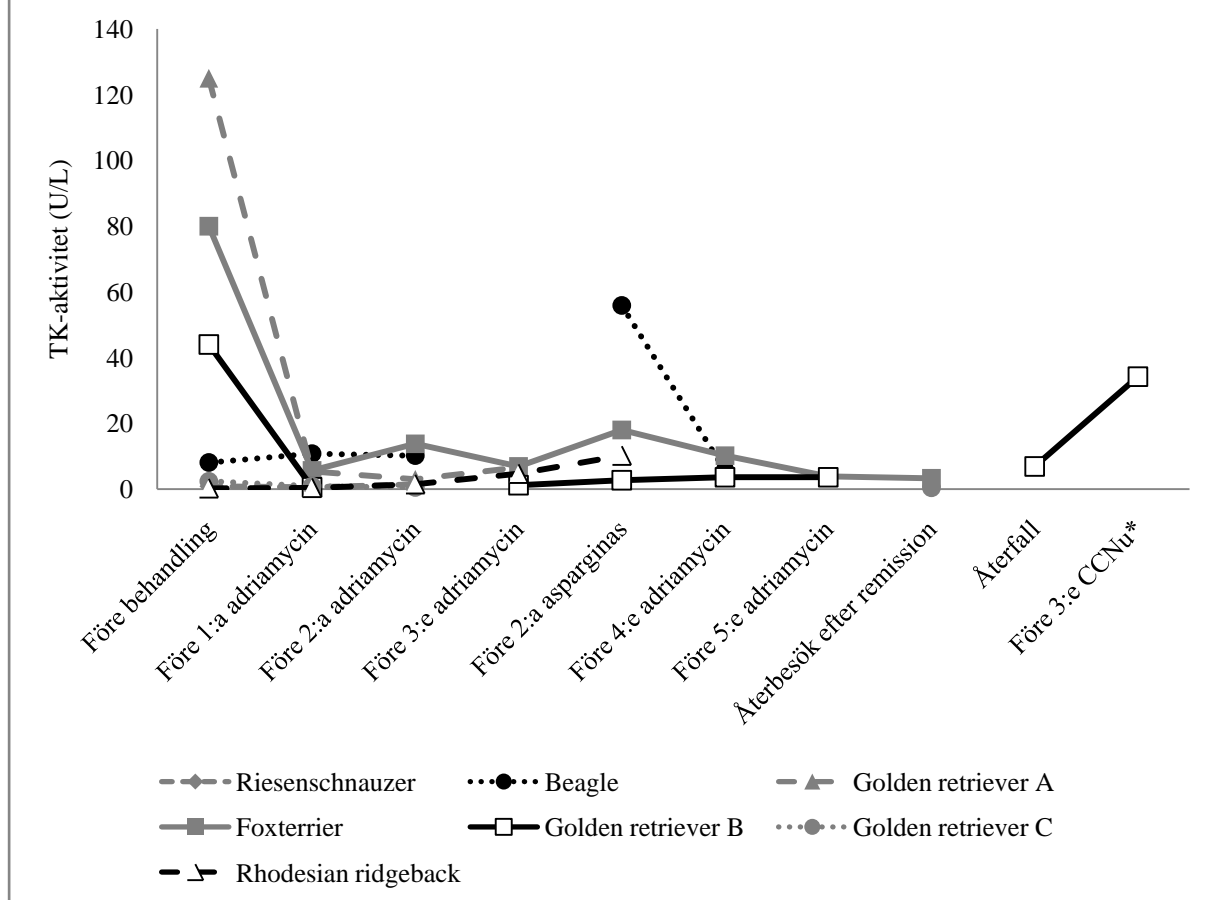
FIGUR 3. AKTIVITETEN HOS THYMIDINKINAS 1 I SERUM FRÅN HUNDAR MED MALIGNT LYMFOM AV OLIKA STADIER



TK-aktivitet i serum hos hundar efter kemoterapi

Vissa av hundarna har behandlats med ADRIA-Plus-protokollet. Serumprover samlades in före varje dos L-asparginas och adriamycin och TK-aktiviten bestämdes med [³H]-dThd-analysen. I alla fall minskade TK1-aktiviteten i serum drastiskt efter den första dosen jämfört med proven före behandling (figur 3).

FIGUR 3. AKTIVITETEN HOS THYMIDINKINAS 1 I SERUM FRÅN HUNDAR MED MALIGNT LYMFOM UNDER KEMOTERAPIBEHANDLING

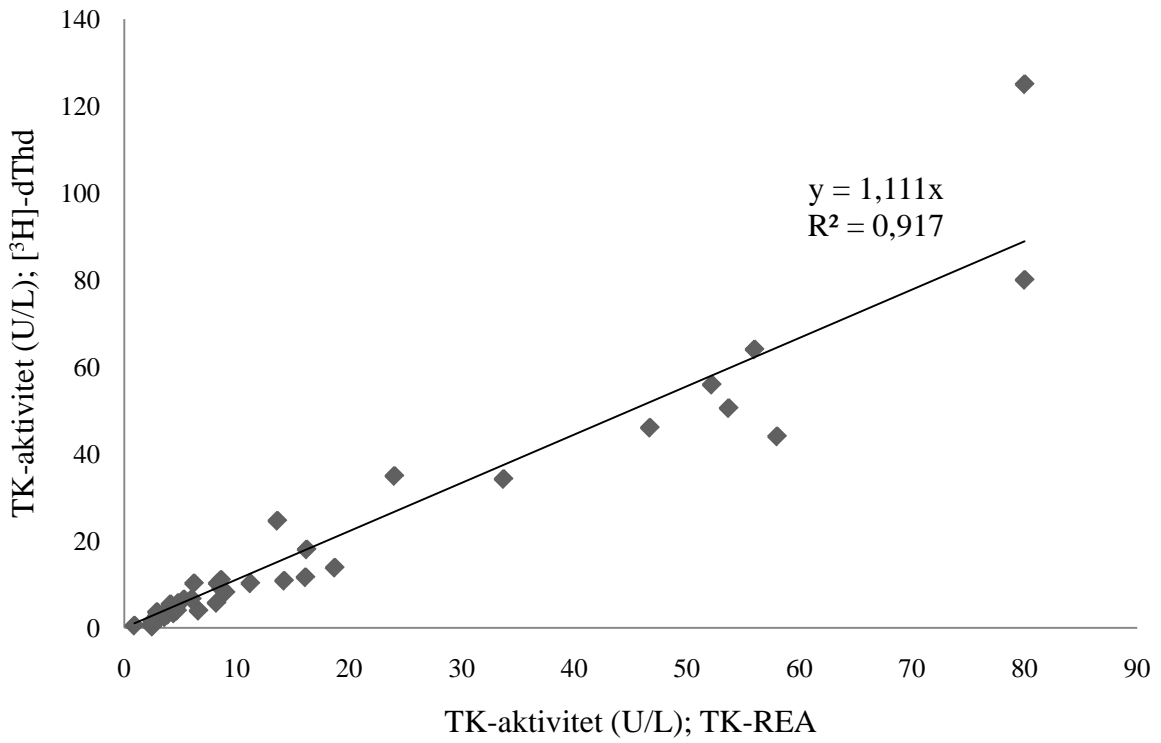


*: CCNu (lomustin) är ett cytostatikum som inte ingår i ADRIA-plus-protokollet utan i detta sammanhang först används vid återfall av cancer.

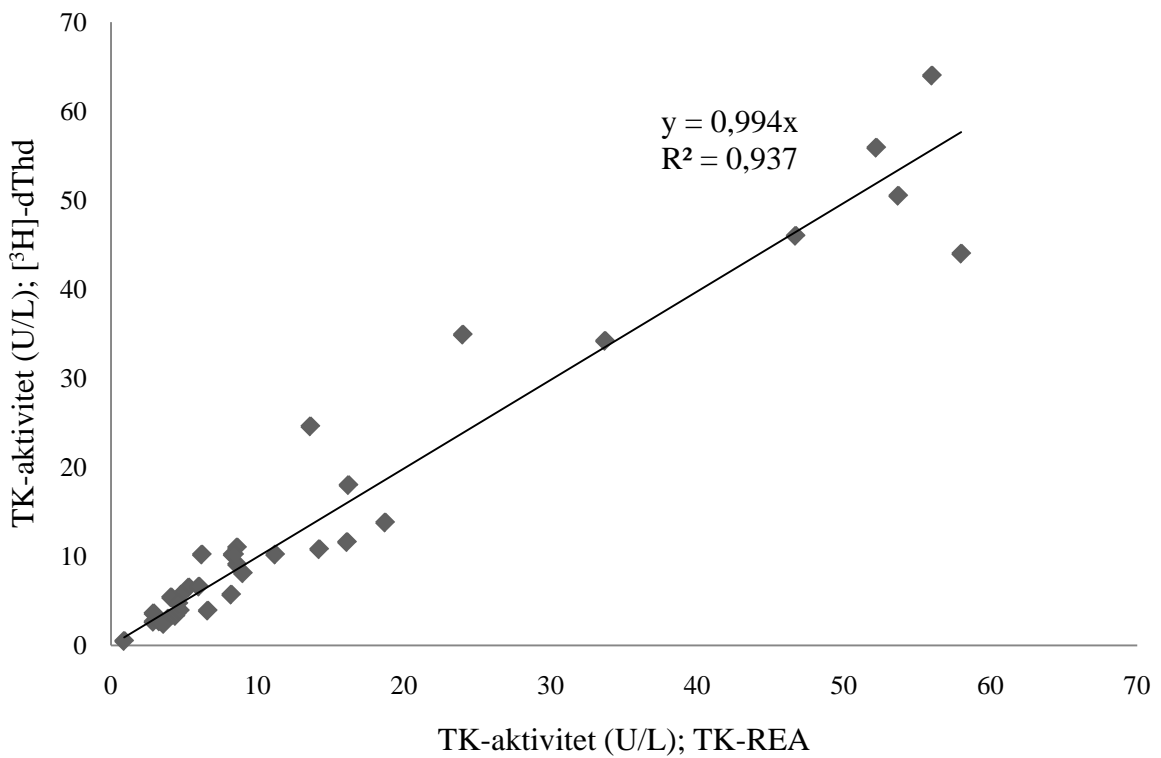
Korrelation mellan [³H]-dThd-analysen och TK-REA

TK-aktivitet i serum hos hundar med malignt lymfom bestämdes också med hjälp av TK-REA. En starkt signifikant korrelation visades mellan TK-REA och [³H]-dThd-analysen ($R = 0,96$, $P < 0,0001$) med hjälp av enkel linjär regression (figur 4 och 5). Som framgår ur tabell 7 är det, av värden på TK-aktiviteten i serum erhållna med hjälp av TK-REA-analysen, enbart värden inom intervallet 2,5 – 80 U/L som anges med exakt numeriskt värde, emedan värden utanför intervallet anges som $< 2,5$ respektive > 80 U/L. I figur 4 har TK-REA-värden (x-axel) $< 2,5$ och > 80 U/L approximerats till 2,5 U/L respektive 80 U/L. I figur 5 däremot, är samtliga prover som har ett TK-REA-värde $< 2,5$ eller > 80 U/L exkluderade.

FIGUR 4. KORRELATION MELLAN $[^3\text{H}]$ -dThd-ANALYSEN (Y-AXEL) OCH TK-REA (X-AXEL)



FIGUR 5. KORRELATION MELLAN $[^3\text{H}]$ -dThd-ANALYSEN (Y-AXEL) OCH TK-REA (X-AXEL)



DISKUSSION

Kinetiska studier av TK1-aktivitet från normala och sjuka hundar har möjliggjort för oss att optimera förhållandena d.v.s. substratkoncentration och volym serumprov för att bestämma TK1-aktiviteten. Med hjälp av denna analys bestämde vi TK1-aktiviteten i serumprover insamlade från normala och sjuka hundar. Resultaten visade att analysen är känslig och snabb och dessutom korrelerar väl med TK-REA-kitet som för närvarande är Gold standard-metod för analys av TK1-aktivitet i serum.

Vidare kunde en signifikant skillnad i TK1-aktivitet påvisas mellan serum från friska hundar och hundar med malignt lymfom. Någon uppenbar skillnad kunde dock inte påvisas mellan patienter med olika stadier av malignt lymfom. Även om de högsta aktivitetsnivåerna observerades hos hundar med malignt lymfom av stadium 4 och 5, hade dessa grupper som helhet inte aktivitetsnivåer väsentligt högre än hundar med stadium 3. Det gick heller inte att uttala sig om huruvida det förelåg någon skillnad mellan friska hundar och hundar med juvertumörer. Endast tre patienter med juvertumörer inkluderades i studien och alla av dem visade en TK1-aktivitet under medelvärdet för den friska gruppen.

Tidigare studier har visat att aktivitetsnivån hos TK1 i serum återgick till normala nivåer efter kemoterapi och ökade innan återfall. I den här studien följdes kemoterapeutisk behandling av hundar med lymfom och TK1-aktiviteten i serum bestämdes efter varje given dos. TK1-nivåerna minskade drastiskt redan efter första dosen och kvarstod på låga nivåer hos hundar som befann sig i remission. En ökning av TK1-nivåerna 1-2 doser efter initiering av kemoterapi hos två patienter observerades vilket kan bero på frisättning i samband med massiv celldestruktion. En ökning av TK1-aktiviteten i serum vid senare skede indikerar återfall av sjukdomen och dålig prognos.

Det finns flera vinster med att vidare förfina diagnostiken inom veterinär-onkologin. Samtidigt som de diagnostiska metoderna ska ge klinikern värdefull information om patientens sjukdomstillstånd får de inte vara smärtsamma, tidskrävande och kostsamma. En väl fungerande tumörmarkör skulle bland fall med ospecifika tumörrelaterade symptom kunna hjälpa till att selektera fram kandidater för mer avancerad diagnostik. Är tillgängligheten god och kostnaden för analysen rimlig skulle fler smådjurskliniker kunna använda sig av metoden för att välja ut patienter lämpliga för utvärdering och eventuell behandling hos specialist. Vidare skulle markören kunna hjälpa till vid ställande av prognos i samband med planering och val av behandling. En markör med potential att identifiera sjukdom redan på biokemisk nivå, i tidigt skede och redan innan sjukdomen blir kliniskt uppenbar, skulle vara av stor betydelse då eventuell behandling har större effekt vid en mindre tumörbörda. En mindre tumörbörda med snabbare tillväxthastighet är sannolikt känsligare för kemoterapi. I samtliga nämnda fall skulle vinster kunna göras med hänsyn till både patientens välmående och djurägarens ekonomiska situation.

Malignt lymfom och juvertumörer är två cancersjukdomar hos hund hos vilka diagnos, behandlingsstrategi, i de fall man väljer att sätta in sådan, och uppföljning skiljer sig åt avsevärt. Medan man hos hundar med malignt lymfom inriktar behandlingen på att via ett

flertal biokemiska mekanismer och under en lång period försöka minska tumörbördan så behandlar man hundar med juvertumörer genom kirurgi vid ett eller möjligtvis flera tillfällen. Kemoterapi kräver under hela behandlingstiden, liksom ofta hos patienter i remission, regelbundna och omfattande kliniska och biokemiska kontroller.

Skillnaderna i den kliniska hanteringen av de båda tumörformerna skulle troligen återspegla sig även i TK-analysens roll som diagnostiskt och prognostiskt verktyg. Vid malignt lymfom följs TK-aktiviteten i serum före, under och efter behandling genom ett icke invasivt ingrepp i form av ett blodprov. Vid juvertumörer skulle betydelsen av en TK-analys troligen bestå i att utgöra ett komplement till befintliga diagnostiska och prognostiska metoder (d.v.s. klinisk, radiologisk och histopatologisk undersökning) som tillämpas strax före med den kirurgiska behandlingen.

Det vore önskvärt att förlänga appliceringen av serum-TK1 som tumörmarkör på solida tumörer. I nuläget har dock få studier utförts som utvärderar TK1-aktiviteten i fast tumörvävnad. De studier som utförts tyder dock på att fasta tumörer, hos både människa och hund, generellt sett inducerar ett betydligt mindre svar i form av enzymaktivitet och att de således är svåra att skilja från normala kontroller. I själva verket kan antikroppsbaseerade analyser av halten TK1 i antingen serum eller i tumörvävnaden i sig visa sig ge en bra bild av malignitetsgraden hos tumören. Fler studier av TK1-uttrycket, både i serum och i cytosolen, är alltså indicerat.

TK1 uppvisar hög homologi mellan människa och hund. Detta innebär inte bara att studier på hundmodeller kan bli mycket informativa och relativt enkla att genomföra, utan också att den erhållna informationen kan appliceras på humanmedicinen.

Sammanfattningsvis har här presenterats en snabb, känslig och ekonomisk metod för att mäta TK-aktivitet i serum under kinetiskt definierade förhållanden.

TACK TILL:

Susanne Pettersson som tack vare stor arbetsinsats möjliggjorde min klinikvistelse i samband med projektet. Klinikvistelsen var i sin tur mycket betydelsefull för min inspiration och motivation under arbetets gång.

Sara Westberg för utmärkt handledning under klinikvistelsen och i samband med sammanställandet av arbetet.

Henrik von Euler för oklanderlig handledning och för snabb och smidig korrespondens. Tack dessutom för pedagogiska och intressanta undervisningar kring såväl medicinska som filosofiska och psykologiska aspekter kring veterinär-onkologi.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Arner, E.S. & Eriksson, S. (1995) Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacology & Therapeutics* 67, 155-186.
- Bryan, J.N. (2010) Tumors of the Hematopoietic System. *Cancer Management in Small Animal Practice*. Maryland Heights, Missouri : Saunders Elsevier. 275-282.
- Dobson, J.M. & Lascelles, B.D.X. (2003) *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. 2.ed. Rutterman, G.R. & Kirpensteijn, J. 234-242.
- Egenvall, A.; Bonnett, B.N.; Ohagen, P.; Olson, P.; Hedhammar, Å.; von Euler, H. (2005) Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med* 69 (1-2): 109-27
- Ellims, P.H.; Eng Gan, T.; Medley, G.; Van Der Weyden, M.B. (1981) Prognostic relevance of thymidine kinase isozymes in adult non- Hodgkin's lymphoma. [online] *Blood*. The American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC. Tillgänglig: bloodjournal.hematologylibrary.org [2011-11-16]
- Eriksson, S.; Munch-Petersen, B.; Johansson, K.; Eklund, H. (2002) Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1327-1346.
- Eriksson, S. Professor, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi. Uppsala. Personligt meddelande via e-post 2011-12-16
- He, Q.; Wang, N.; Skog, S.; Eriksson, S.; Tribukait B (1996) Characterization of a peptide antibody against a C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine kinase, which is a marker for cell proliferation. *European Journal of Cell Biology* 70: 117-124.
- He, Q.; Zou, L.; Zhang, P.A., Lui, J.X., Skog, S., Fornander, T. (2000) The clinical significance of thymidine kinase 1 measurement in serum of breast cancer patients using anti-TK1 antibody. *International Journal of Biological Markers* 15, 139-146.
- Henry C.J. (2010) Mammary Tumors. *Cancer Management in Small Animal Practice*. Maryland Heights, Missouri : Saunders Elsevier. 275-282.
- Lana, S.E.; Rutterman.; G.R, Withrow, S.J. (2007) Tumors of the Mammary Gland. *Small Animal Clinical Oncology*. 4. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier. 619-628.
- Misdorp, W.; Else, R.W.; Hellmen, E.; Lipscomb, T.P. (1999) Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. WHO International Histological Classification of Tumors in Domestic Animals. *Armed Forces Institute of Pathology*
- Nakamura, N.; Momoi, Y.; Watari, T.; Yoshino, T.; Tsujimoto, H.; Hasegawa, A. (1997) Plasma Thymidine Kinase Activity in Dogs with Lymphoma and Leukemia. *The Journal of Veterinary Medical Science* 59: 957-960
- Nelson, R.W.; Couto, C.G. (2009) [a] Postpartum and Mammary Disorders. *Small Animal Internal Medicine*. 4. ed. St. Louis, Missouri : Mosby Elsevier. 944-949.
- Nelson, R.W.; Couto, C.G. (2009) [b] Lymphoma in the Cat and Dog. *Small Animal Internal Medicine*. 4. ed. St. Louis, Missouri : Mosby Elsevier. 1174-1185.
- Piek, C.J., Rutterman, G.R. & Teske, E. (1999) Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma, *Vet Quart* 21. 44-49.

- Sorenmo, K. (2003) Canine Mammary Gland Tumours. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice* 33. 573-596.
- Vail, D.M. & Young, K.M. (2007) Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemia. *Small Animal Clinical Oncology*. 4. ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier. 619-628.
- Wang, N.; He, Q.; Skog, S.; Eriksson, S., Tribukait, B. (2001) Investigation on cell proliferation with a new antibody against thymidine kinase 1. *Analytical Cellular Pathology* 23: 11-19.
- Welch Fossum, T. (2007) Surgery of the Female Reproductive Tract. *Small Animal Surgery*. 3.ed. 729-735.
- von Euler, H. (2011) Tumours of the mammary glands. *British Small Animal Veterinary Association (BSAVA) Manual of Canine and Feline Oncology*. Eds Dobson, J.M. & Lascelles, B.D.X. Chapter 16, 237-247
- von Euler, H & Eriksson, S. (2010) Comparative aspects of the proliferation marker thymidine kinase 1 in human and canine tumour diseases. *Veterinary and Comparative Oncology*, 1-15.
- von Euler, P.H.; Rivera, P.; Aronsson, A.; Bengtsson, C.; Hansson, L.; Eriksson, S.K. (2008) Monitoring therapy in canine malignant lymphoma and leukemia with serum thymidine kinase 1 activity – evaluation of a new, fully automated non-radiometric assay. *International Journal of Oncology* 34, 505-510.
- von Euler, P.H.; Öhrvik, A. B.; Eriksson S.K. (2006) A non-radiometric method for measuring serum thymidine kinase activity in malignant lymphoma in dogs. *Research in Veterinary Science* 80, 17-24.
- von Euler, H.; Einarsson, R.; Olsson, U.; Lagerstedt, A.; Eriksson, S. (2004) Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease. *J Vet Intern Med* 18(5), 696-702.
- Von Euler, H. Institutionen för kirurgi och medicin, smådjur, Veterinärmedicinska fakulteten, Sveriges Lantbruksuniversitet. [online] Min hund har malignt lymfom. Tillgänglig: <http://www.slu.se> [2011-10-04]
- Voeller, D.M.; Parr, A.; Allegra, C.J. (2001) Development of human anti-thymidine kinase antibodies. *Anticancer Drugs* 12: 555-559.
- Wu, C.J.; Yang, R.J.; Zhou, J. *et al.* (2003) Production and characterization of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *Immunological Methods* 277:157-169.
- Zhang, F.; Shao, X.; Li, H.; Robison, J.G.; Murray, B.K., O'Neill, K.L. (2001) A monoclonal antibody specific for human thymidine kinase 1. *Hybridoma* 20: 25-34.
- Öhrvik, A.; Lindh, M.; Einarsson, R.; Grassi, J.; Eriksson, S. (2004) Sensitive Nonradiometric Method for Determining Thymidine Kinase 1 Activity. *Clinical Chemistry* 50:9, 1597-1606.

BILAGOR

TABELL 6. AKTIVITETEN HOS THYMIDINKINAS I I SERUM FRÅN NORMALA HUNDAR

Fall nr.	Ras	Ålder (år)	Kön	TK-aktivitet (U/L)
1	Bavarian Mountain hound	4	H	1,2
2	Labrador retriever	6	H	1,2
3	Labrador retriever	4	H	0,3
4	Labrador retriever	6	H	0,9
5	Labrador retriever	3	T	1,2
6	Labrador retriever	6	T	0,3
7	Schäfer	3	H	3,3
8	Schäfer	3	T	3,3
9	Schäfer	1	T	4,5
10	Schäfer	3	T	6,0
11	Landseer	3	H	1,8
12	Riesenschnauzer	3	H	1,5
13	Riesenschnauzer	6	H	1,2
14	Riesenschnauzer	8	H	0,8
15	Blandras	5	T	2,4
16	Blandras	9	H	2,4
17	Blandras	5	T	1,8
18	Blandras	4	T	1,2
19	Bostonterrier	6	T	3,3
20	Beagle	3	T	5,7
21	Beagle	3	T	5,4
22	Norfolkterrier	2	T	4,8
23	Bedlingtonterrier	7	T	1,5
24	Jack Russell	8	T	1,8
25	Nova Scotia duck tolling retriever	2	T	3,3
26	Boxer	4	H	0,8
27	Boxer	5	H	3,0
28	Welsh Springer spaniel	5	T	0,9
29	Rottweiler	5	T	0,8
30	Rottweiler	2	T	1,2
31	English Springer spaniel	10	T	0,5
32	Appenzeller sennen	12	T	1,2
33	Tax	3	T	3,3
34	Flat coated retriever	2	T	0,8
35	Flat coated retriever	9	T	4,2
36	Flat coated retriever	5	T	3,6
37	Flat coated retriever	3	T	2,1
38	Flat coated retriever	4	H	0,8
39	Golden retriever	4	T	0,8
40	Golden retriever	11	H	3,9

TK-värden representerar medelvärde av fyra mätningar utförda m.h.a.³H]-dThd-analysen.

T = Tik; H = Hanhund

Observera att fallnumren inte nödvändigtvis stämmer överrens med fallnummer i övriga tabeller.

TABELL 7. AKTIVITETEN HOS THYMIDINKINAS 1 I SERUM FRÅN HUNDAR MED MALIGNT LYMFOM, UPPMÄTT MED [³H]-Thd-ANALYSEN OCH MED TK-REA

Fall nr.	Ras	Kön	Ålder (år)	Prov nr	[³ H]-Thd-analys (U/L)	TK-REA (U/L)
1	Norsk buhund	H	9		3,3	4,4
2	Irländsk setter	T	7	A	11	8,6
				B	2,65	2,9
3	Shetland sheepdog	T	10		11,6	16,1
4	Dvärgschnauzer	H	5	A	9,1	8,6
				B	6,5	5,3
5	Blandras	H	5		64	56
6	Riesenschnauzer	(T)	9	A	0,85	< 2,5
				B	0,55	< 2,5
7	Beagle	(T)	11	A	8,1	9
				B	10,8	14,2
				C	10,2	11,2
				D	55,9	52,2
				E	5,7	4,8
8	Blandras	T	5	A	125	> 80
				B	5,4	4,1
				C	3	3,9
				D	6,6	6
9	Schäfer	H	5		24,6	13,6
10	Lanchester heeler	H	10		2,4	3,6
11	Foxterrier	(T)	10	A	80	> 80
				B	5,7	8,2
				C	13,8	18,7
				D	18	16,2
				E	10,2	8,3
				F	3,9	6,6
12	Golden retriever	H	8	A	44	58
				B	0,55	< 2,5
				C	1,2	< 2,5
				D	2,7	3,3
				E	3,6	2,9
				F	3,6	4,5
				G	34,2	33,7
13	West highland white terrier	T	11		3,9	4,7
14	Flat coated retriever	T	8		50,5	53,7
15	Blandras	H	5		46	46,7
16	Riesenschnauzer	H	8		34,9	24
17	Cocker spaniel	(H)	8		10,2	6,2
18	Golden retriever	H	13	A	0,94	< 2,5
				B	0,49	0,9
				C	0,4	< 2,5
19	Rhodesian ridgeback	H	4	A	0,25	< 2,5
				B	1,5	< 2,5
				C	4,7	4,6
				D	10,2	8,4

TK-värden från [³H]-Thd-analysen representerar medelvärde av fyra mätningar.

T = Tik; H = Hanhund; (T) = Honkastrat; (H) = Hankastrat

Observera att fallnumren inte nödvändigtvis stämmer överrens med fallnummer i övriga tabeller.

TABELL 8. AKTIVITETEN HOS THYMIDINKINAS I I SERUM FRÅN HUNDAR MED MALIGNT LYMFOM, FÖRE EV. BEHANDLING MED CYTOSTATIKA

Fall nr.	Ras	Kön	Ålder (år)	Sjukdoms-stadium	TK-aktivitet (U/L)
1	Norsk buhund	H	9		3,3
2	Irländsk setter	T	7		11
3	Shetland sheepdog	T	10		11,6
4	Blandras	H	5		64
5	Border collie	T	12	III	8,3
6	Golden retriever	T	9	V	2,5
7	Golden retriever	H	8	V	1,8
8	Riesenschnauzer	(T)	9	I	0,9
9	Beagle	(T)	11	III	8,1
10	Blandras	T	5	IV	125
11	Rhodesian ridgeback	H	9	V	28,5
12	Schäfer	H	5	IV	24,6
13	Lancashire heeler	H	10	III	2,4
14	Golden retriever	H	6	V	3
15	Foxterrier	(T)	10	IV	80
16	Golden retriever	H	8	IV	44
17	West highland white terrier	T	11	III	3,9
18	Flat coated retriever	T	8	III	50,5
19	Blandras	H	5	III	46
20	Riesenschnauzer	H	8	III	34,9
21	Nova Scotia duck tolling retriever	H	14	V	228
22	Cocker spaniel	(H)	8	V	10,2
23	Golden retriever	H	13	V	2,4
24	Rhodesian ridgeback	H	4		0,25

TK-värden från [³H]-Thd-analysen representerar medelvärde av fyra mätningar.

T = Tik; H = Hanhund; (T) = Honkastrat; (H) = Hankastrat

Observera att fallnumren inte nödvändigtvis stämmer överrens med fallnummer i övriga tabeller.

TABELL 9. AKTIVITETEN HOS THYMIDINKINAS I I SERUM FRÅN HUNDAR MED JUVERTUMÖRER

Fall nr.	Ras	Ålder (år)	TK-aktivitet (U/L)
1	Rottweiler	6	0,25
2	Engelsk springer spaniel	12	2,4
3	Collie	9	1,2