

Fluorescentie-geleide chirurgie voor de resectie van caniene tumoren: een vergelijkende literatuurstudie tussen twee potentiële doelwitproteïnen

Image-guided surgery for the resection of canine tumors: a comparison of two potential target proteins

¹L. Joos, ^{1,2}S. Favril, ^{1,2}H. de Rooster

¹Vakgroep Kleine Huisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, België

²Cancer Research Institute Ghent (CRIG), Medical Research Building, Universitair Ziekenhuis, Universiteit Gent, 9000 Gent, België

hilde.derooster@ugent.be

SAMENVATTING

Na chirurgische resectie van een solide tumor bij honden en mensen is lokaal recidief een belangrijk risico. De klassieke technieken voor visuele inspectie, palpatie en de bepaling van intraoperatieve tumormarges zijn weinig nauwkeurig. Fluorescentie-geleide chirurgie kan een belangrijke rol spelen in de oncologische chirurgie. Tumor-specifieke liganden, gekoppeld aan een fluorescente stof, kunnen tumorcellen op een accurate manier aankleuren door te binden aan hun doelwitproteïne, en daardoor de kans op volledige chirurgische verwijdering van de tumor verhogen. In deze literatuurstudie werd een vergelijking gemaakt tussen twee potentieel interessante doelwitproteïnen voor gebruik bij fluorescentie-geleide oncologische chirurgie in de diergeneeskunde, zijnde cycline D1 en “epidermal growth factor receptor” (EGFR). Het voornaamste evaluatiecriterium is tumorspecificiteit, waarbij er hoge expressie is in het tumorweefsel en weinig tot geen expressie in het omliggende, gezonde weefsel. Ook de bereikbaarheid van het proteïne voor de ligand, waarbij expressie op de celmembraan de voorkeur geniet ten opzichte van intracellulaire expressie, is een evaluatiecriterium. Door zijn betere beschikbaarheid en betere specificiteit lijkt EGFR meer aangewezen voor fluorescentie-geleide oncologische chirurgie bij honden dan cycline D1. Door de grote diversiteit in eiwitexpressie tussen verschillende tumoren is het echter belangrijk om resultaten inzake toepasbaarheid niet te veralgemenen voor andere types tumoren. Hoewel studies en toepassingen uit de humane geneeskunde richtinggevend kunnen zijn voor toepassingen in de diergeneeskunde, mogen onderzoeksresultaten niet rechtstreeks vertaald worden naar andere species.

ABSTRACT

After surgical resection of a solid tumor in dogs and humans, local recurrence is an important risk. The standard techniques to determine intraoperative margins, visual inspection and palpation are not very accurate. Fluorescence-guided surgery can play an important role in oncologic surgery. Tumor-specific ligands, conjugated to a fluorescent dye, can accurately stain cancer cells by binding to their target protein, thereby increasing the chance of complete surgical removal of the tumor. In this comparative study, a comparison is made between two potentially interesting target proteins for their use in fluorescence-guided oncologic surgery in veterinary medicine. The main evaluation criteria for a suitable target protein are tumor-specificity, with a high expression in tumor tissue and little or no expression in the surrounding normal tissues, and accessibility of the protein to the ligand, with expression on the cell membrane being preferred above intra-cellular expression. Due to the heterogeneity in protein expression between different tumor types, it is important that the expression of a ligand in a certain tumor type is investigated before its use as a target for fluorescence-guided surgery.

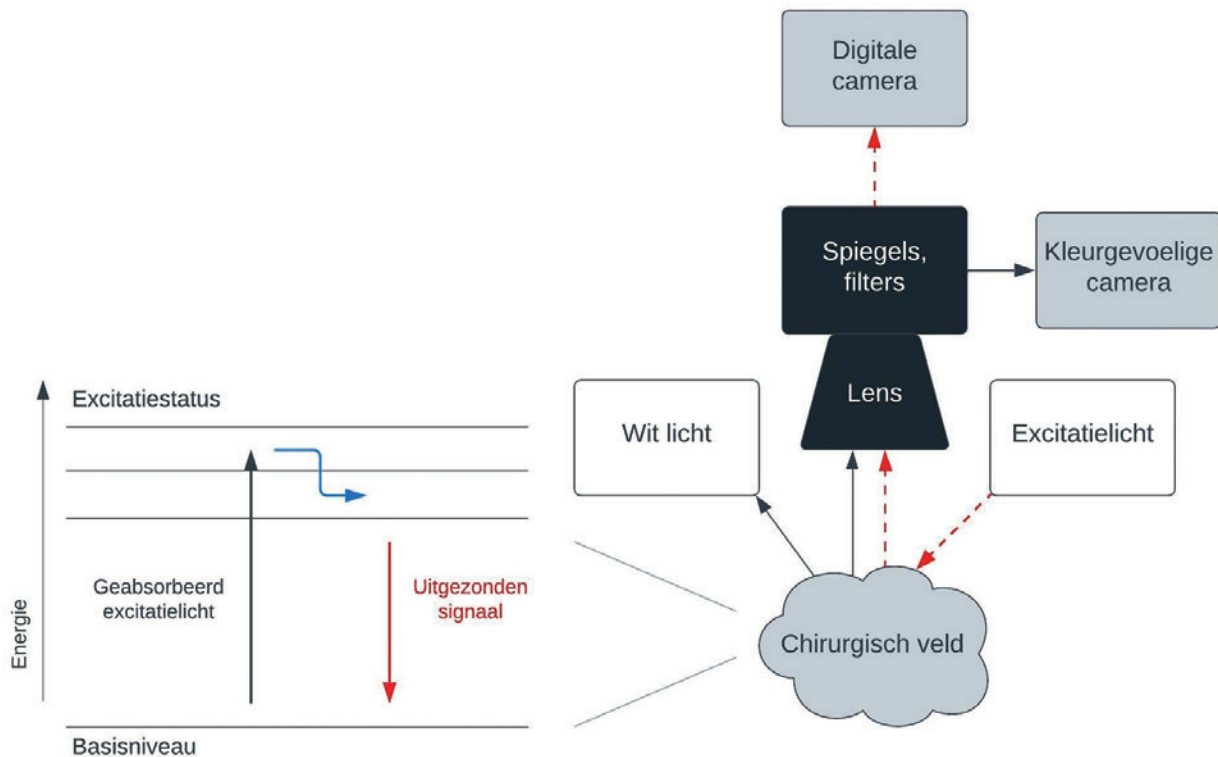
INLEIDING

Tumoren zijn een veelvoorkomend probleem bij oudere honden en katten. Er zijn verschillende therapieën mogelijk, maar chirurgische verwijdering van het tumorale ontaarde weefsel is voor de meeste tumortypes de beste therapeutische optie (Rosenthal, 2014).

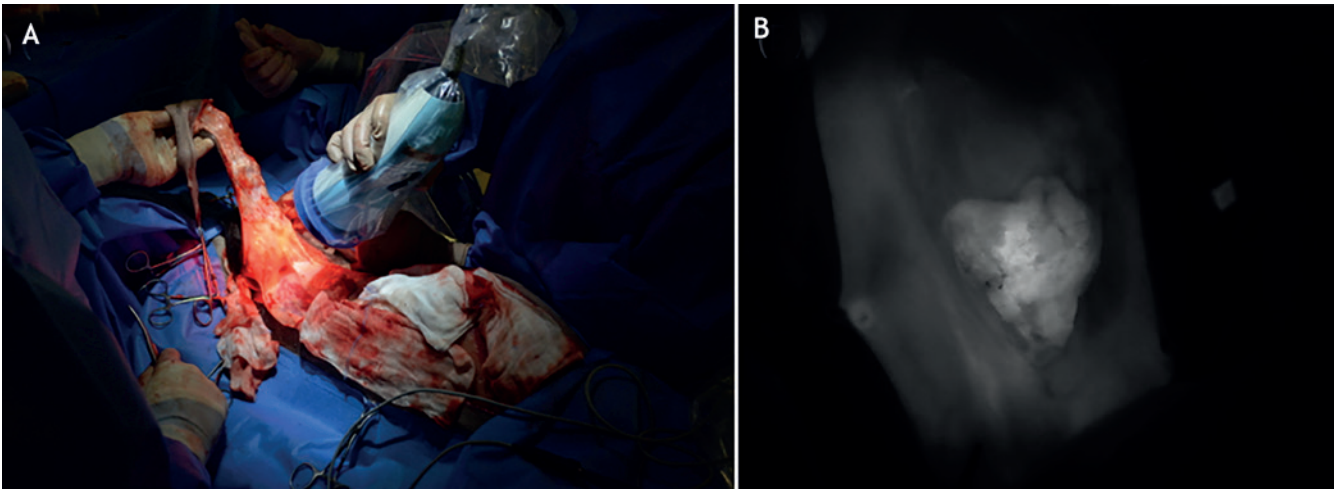
Het tumorale weefsel onderscheiden van het gezonde weefsel is de grote uitdaging bij chirurgische verwijdering van het tumorale weefsel (Favril et al., 2018). Complete tumorresectie is echter van cruciaal belang in oncologische chirurgie. Negatieve chirurgische marges leiden namelijk tot een gunstigere prognose (Keereweer et al., 2011; Visgauss et al., 2016). Momenteel is men aangewezen op visuele inspectie en palpatie om het abnormale van het gezonde weefsel te onderscheiden tijdens chirurgie. Er worden echter frequent recidieven gezien omdat tumorvrije marges op deze manier niet kunnen gegarandeerd worden (Keereweer et al., 2011; Hernot et al., 2019). Dit komt doordat visuele inspectie en palpatie te subjectief zijn en sterk afhankelijk zijn van de ervaring van de chirurg. Hierdoor blijft er soms tumorale weefsel aanwezig, wat leidt tot recidieven (Predina et al., 2019). Daarnaast moet echter vermeden worden om te grote marges rond de tumor weg te nemen aangezien

dit onnodige schade aan de omliggende organen kan toebrengen. Het is bij oncologische chirurgie dus van cruciaal belang om de lokalisatie en de uitgebreidheid van de tumor zo exact mogelijk te bepalen (Tringale et al., 2018). De traditionele methoden, zoals radiografie, CT- of MRI-scan bieden enkel een beter beeld voorafgaand aan de chirurgie, maar zijn niet geschikt om de marges tijdens chirurgie te identificeren (Hernot et al., 2019). Er werd in de humane geneeskunde reeds veel onderzoek verricht naar methoden die gebruikt kunnen worden om tumorcellen intraoperatief beter te identificeren en lokaliseren. Een techniek die de laatste jaren steeds belangrijker wordt, is fluorescentie-geleide chirurgie (Nagaya et al., 2017). Met behulp van fluorescentie-geleide chirurgie kan de incidentie van positieve tumormarges verlaagd worden (Hernot et al., 2019). Daarnaast is er ook steeds meer vraag naar specifieke methoden om verschillende weefseltypen zichtbaar te maken door het toegenomen gebruik van minimaal invasieve chirurgische technieken, zoals laparoscopische chirurgie. Bij laparoscopie kan namelijk geen beroep gedaan worden op palpatie om kwaadaardige van goedaardige weefsels te onderscheiden (van Manen et al., 2018).

In de oncologie kan fluorescentie-geleide chirurgie een oplossing bieden om structuren die verwijderd moeten worden, correct te identificeren. Voor deze



Figuur 1. Schematische weergave van fluorescentie-geleide beeldvorming tijdens de chirurgische resectie van een tumor. De patiënt krijgt intraveneus een fluorescente stof toegediend die zal accumuleren in de tumor. Een gespecialiseerde camera zendt excitatielicht uit op de regio van de tumor. De fluorescente stof in de tumor absorbeert het licht en zal daardoor geëxciteerd worden en in een hogere energietoestand gaan. Na verloop van tijd keert de fluorescente stof terug naar zijn lagere energietoestand. Daarbij zendt de stof een fluorescent signaal uit dat kan worden gedetecteerd door de camera (Naar: Favril et al., 2018).



Figuur 2. A. Een fluorescente camera (Fluobeam, Fluoptics) schijnt intraoperatief op een omgeplooid melkklierlijst waarin een mammair adenocarcinoom aanwezig is. **B.** De tumor zendt een fluorescent signaal uit, waardoor tumoraflijning mogelijk is. Het omliggende melkklierweefsel en de huid fluoresceren niet (Figuren uit: Favril et al., 2018).

toepassing wordt een fluorescente stof toegediend die in tumorale weefsel accumuleert. Wanneer nadien de tumor belicht wordt met een speciale camera, raakt de fluorescente stof geëxciteerd en zendt een fluorescent signaal uit dat zichtbaar wordt gemaakt (Gioux et al., 2010; Visgauss et al., 2016) (Figuur 1 en 2). Er bestaan twee types fluorescente producten: niet-specifieke en specifieke producten. Enkel niet-specifieke producten, met name indocyanine-groen en methyleenblauw, zijn reeds goedgekeurd door de “Food and Drug Administration” (FDA) voor fluorescentie-geleide chirurgische resectie van tumoren in de humane geneeskunde (Schaafsma et al., 2011; Lee et al., 2015). Dezelfde producten worden ook gebruikt bij de detectie van lymfeknopen, vitale structuren en weefsel doorbloeding (van Manen et al., 2018). Bij oncologische toepassingen is echter bekend dat deze niet-specifieke producten accumuleren bij verhoogde permeabiliteit van de regionale bloedvaten en bij verminderde regionale lymfedrainage (Holt et al., 2014; Rosenthal et al., 2014; van Manen et al., 2018). Deze veranderingen zijn niet alleen in het tumorale weefsel zelf aanwezig maar ook bij (onder andere peritumorale) inflammatie (Rosenthal, 2014; van Manen et al., 2018). Er is dus nood aan meer specifieke producten.

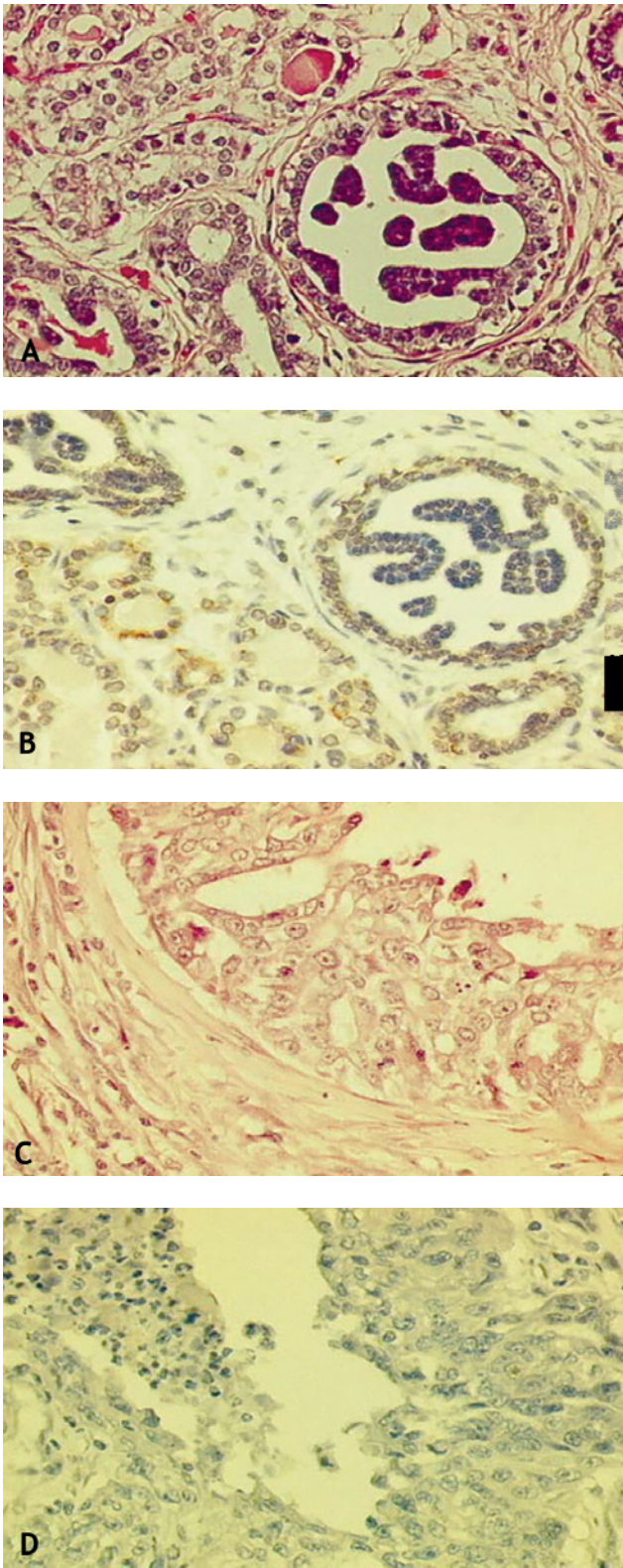
Er is momenteel een zoektocht naar geschikte tumor-specifieke liganden (monoklonale antistoffen, peptiden, “nanobodies”, etc.) om die te binden aan een fluorescente contraststof die met behulp van een specifieke camera geactiveerd en in beeld gebracht wordt (Favril et al., 2018). Om een goed onderscheid te kunnen maken tussen het tumorale en het gezonde weefsel moet er dus gewerkt worden met liganden die een affiniteit hebben voor proteïnen die tot overexpressie gebracht worden door tumoren, maar niet of slechts in geringe mate aanwezig zijn in gezond weefsel (Low et al., 2018). Daarnaast is het ook van belang dat de overexpressie veralgemeend voorkomt bij een bepaald type tumor en niet slechts bij enkele

individuele tumoren van dat type. Een ander aspect dat belangrijk is voor een succesvol tumor-specifiek fluorescent product is dat het doelwitproteïne vlot bereikbaar is. Zo is het bijvoorbeeld eenvoudiger om een fluorescent product te laten binden op proteïnen op de celmembraan dan op intracellulaire proteïnen (Favril et al., 2018; Tringale et al., 2018; Londhe et al., 2019). Het product dient dan de cel niet binnen te dringen.

Gezien de potentiële meerwaarde van fluorescentie-geleide chirurgie in de humane geneeskunde rijst de vraag of fluorescente stoffen ook in de diergeneeskunde voor vooruitgang kunnen zorgen voor intraoperatieve begeleiding tijdens chirurgische verwijdering van tumoren.

DE ZOEKTOCHT NAAR GESCHIKTE DOELWITPROTEÏNEN VOOR FLUORESCENTIE-GELEIDE CHIRURGIE

In de zoektocht naar geschikte doelwitten werd er gestart met het verzamelen van informatie over verschillende eiwitten die tot overexpressie gebracht worden in humane tumoren en waarvoor reeds commerciële therapeutische antilichamen beschikbaar waren voor mensen. Zo’n therapeutisch antilichaam zou namelijk kunnen gebruikt worden voor de identificatie van tumorweefsel tijdens chirurgie door aan een fluorescente stof te binden (Rosenthal et al., 2015). In de humane geneeskunde wordt EGFR beschouwd als een goed doelwit bij kankerpatiënten (McKay et al., 2002; Kim en Diehl, 2009) en er werd reeds onderzoek verricht naar het monoklonale “anti-epidermal growth factor receptor” (EGFR) antilichaam Cetuximab (Singer et al., 2014; Huang et al., 2017). Hetzelfde geldt voor de multifunctionele proteïne cycline D1, die bij veel verschillende tumoren een rol blijkt te spelen en waartegen recent een klein antilichaam



Figuur 3. Histopathologie en immunohistochemie van cycline D1-positieve letsels aan de melkklier. A. Histopathologie van een melkklierdysplasie bij een zeven jaar oude poedel. B. Verschillende celkernen reageren positief op immunohistochemie bij het dysplastisch melkklierepitheel uit bovenstaand letsel. C. Histopathologie van een invasief adenocarcinoom bij een tien jaar oude Duitse herder. D. Verschillende celkernen reageren positief op immunohistochemie in het neoplastisch epitheel (Figuren uit: Sfacteria et al., 2003).

AD κ werd ontwikkeld (Wu et al., 2020). Omdat in de diergeneeskundige literatuur daarenboven bij verschillende caniene tumoren overexpressie van bovengenoemde doelwitproteïnen wordt beschreven (Tabel 1), vonden de auteurs van de voorliggende studie het interessant om cycline D1 en EGFR onderling te vergelijken. Voor deze twee proteïnen werd onderzocht of ze ook in de diergeneeskunde, meer specifiek bij honden met tumoren, van belang zouden kunnen zijn bij fluorescentie-geleide chirurgie. Om de geschiktheid van cycline D1 en EGFR als doelwitten voor fluorescentie-geleide chirurgie te evalueren, werden de tumorspecificiteit en locatie en/of beschikbaarheid van beide eiwitten in tumoraal weefsel bij honden geëvalueerd.

TUMORSPECIFICITEIT

Een eerste factor die in rekening gebracht dient te worden bij de keuze van een geschikt doelwit voor fluorescentie-gerichte chirurgie is de tumorspecificiteit (Hernot et al., 2019). De gebruikte merker moet in grote mate binden aan de tumorcellen, maar bindt bij voorkeur niet of slechts in geringe mate aan gezonde weefsels om een grote tumor-tot-achtergrond verhouding te bekomen (Low et al., 2018). Hiervoor moet het doelwitproteïne in sterk verhoogde mate aanwezig zijn in de tumorcellen en veel minder in de omgevende normale weefselcellen. Enkel op die manier lichten tumorcellen op terwijl de achtergrond significant minder fluorescent is (Hernot et al., 2019).

Wat betreft cycline D1 werd er met behulp van immunohistochemie een significante overexpressie aangetoond bij orale melanomen, mammatumoren en multipale myelomen bij de hond (Cangul et al., 2002; Sfacteria et al., 2003; Klopfleisch et al., 2011; Zamboni et al., 2020). Cycline D1 is belangrijk voor de progressie van de celcyclus en blijkt meer geschikt voor gebruik in vroege stadia van de ziekte dan wanneer het proces reeds vergevorderd is (Sfacteria et al., 2003) (Figuur 3). Daarnaast was er in de studie van Sfacteria et al. (2003) slechts bij 60% van de honden met mammatumoren een duidelijke overexpressie aanwezig, waardoor er ook een relatief grote groep overbleef, waarbij de identificatie en lokalisatie van de tumor niet konden worden uitgevoerd gebruik makend van dit doelwit (Figuur 4). Deze laatste beperking werd ook gezien bij caniene orale melanomen en multipale myelomen (Cangul et al., 2002; Zamboni et al., 2020). Bij deze tumoren konden in de studies van Cangul et al. (2002) en Zamboni et al. (2020) respectievelijk bij 69% en 50% van de gevallen een duidelijke overexpressie aangetoond worden. Wat betreft hemangiosarcomen zijn er indicaties dat cycline D1 bij honden een rol zou kunnen spelen, maar dit is nog onvoldoende onderzocht (Yonemaru et al., 2007). De huidige studies wijzen er ook op dat overexpressie van cycline D1 bij honden zeldzaam is bij cutane

Tabel 1. Belangrijkste eigenschappen van cycline D1 en Epidermal Growth Factor Receptor rekening houdend met verschillende soorten caniene tumoren (Murakami et al., 2000; Cangul et al., 2002; Sfacteria et al., 2003; Yonemaru et al., 2007; Gama et al., 2009; Sabattini et al., 2014; Hanazono et al., 2015; Fraser et al., 2016; Veloso et al., 2020; Zamboni et al., 2020).

	Cycline D1	Epidermal Growth Factor Receptor
Tumorspecificiteit	Oraal melanoom: + Mammair carcinoom: + Multipel myeloom: + Hemangiosarcoma: - Plaveiselcelcarcinoom: - Plasmacytoom: -	Overgangscelcarcinoom: +++ Primaire longkanker: ++ Glioom: + Mammair carcinoom: +- Melanoom: -
Locatie / beschikbaarheid	Intracellulair → celkern / cytoplasma	Transmembranair eiwit → celmembraan

+++; Tumortype vertoont 100% overexpressie van het doelwit; ++: Tumortype vertoont meer dan 75% overexpressie van het doelwit; +: Tumortype vertoont meer dan 50% overexpressie van het doelwit; +/-: Tumortype vertoont meer dan 25% overexpressie van het doelwit; -: Tumortype vertoont minder dan = 25% overexpressie van het doelwit

melanomen, squameus celcarcinomen en plasmacytomen (Murakami et al., 2000; Cangul et al., 2002; Zamboni et al., 2020).

Op basis van tumorspecificiteit lijkt het aangewezen om verder onderzoek naar fluorescentie-geleide chirurgie met behulp van cycline D1 te richten op mammatumoren, orale melanomen en multipole myelomen. Voor de overige tumoren lijkt de expressie bij de hond te laag of is er nog onvoldoende onderzoek verricht.

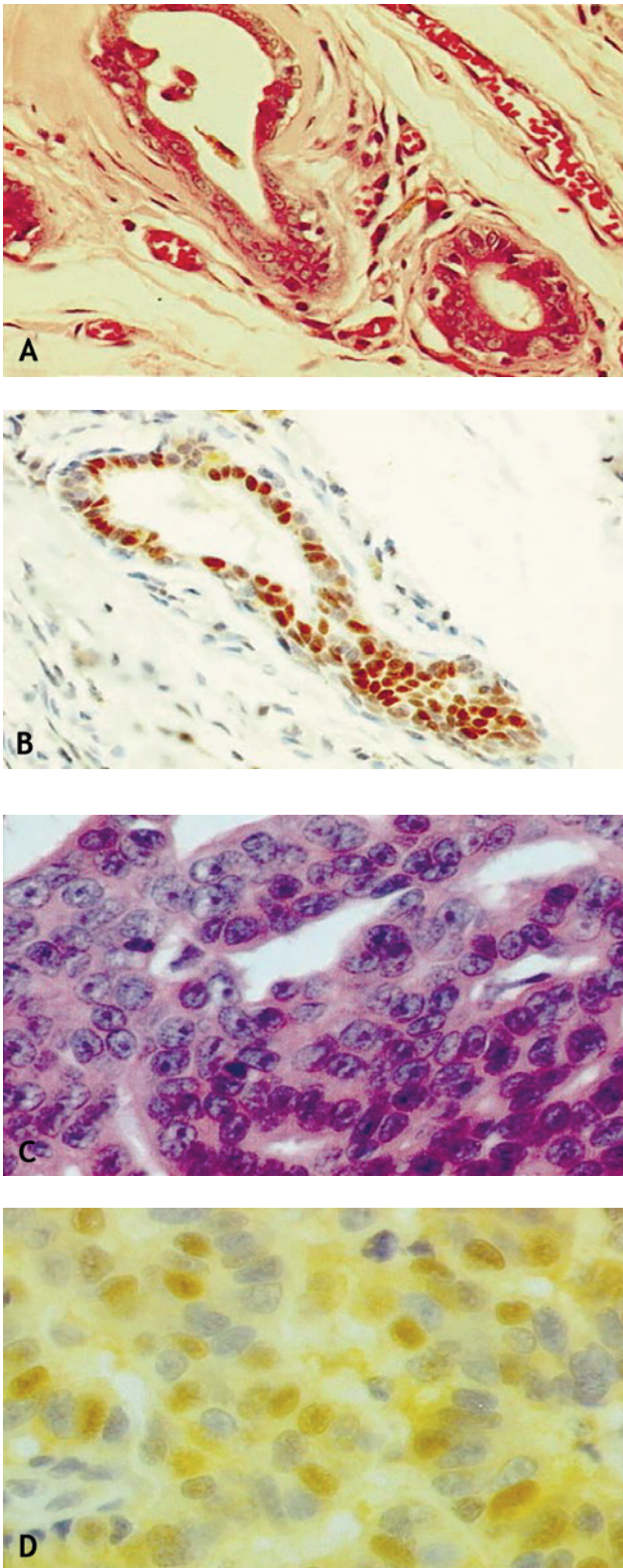
Ook bij EGFR zijn er grote verschillen in expressie tussen de verschillende soorten caniene tumoren (Rutteman et al., 1994; Sabattini et al., 2014; Singer et al., 2014; Hanazono et al., 2015; Araújo et al., 2016; Fraser et al., 2016; Veloso et al., 2020). Er is één soort tumor die een zeer hoge expressie van EGFR vertoont bij de hond. In een studie van Hanazono et al. (2015) kon namelijk overexpressie van EGFR aangetoond worden bij 100% van de onderzochte overgangscelcarcinomen van de urineblaas. Bij gezonde of ontstoken weefsels kon er in de studie nauwelijks of geen overexpressie worden aangetoond. Hoewel EGFR hierdoor een perfect doelwit voor fluorescentie-geleide chirurgie bij dit type tumoren lijkt, moet rekening gehouden worden met excretie van de fluorescente stof via de urine (Mochida et al., 2018).

Ook bij primaire longtumoren bij honden wordt in hoge mate overexpressie van EGFR vastgesteld (Sabattini et al., 2014). Het nadeel bij dit type tumoren is echter dat de overexpressie niet homogeen verdeeld is over het tumorale ontaarde weefsel. In de studie van Sabattini et al. (2014) werden er variaties van 22-100% gezien wat betreft tumorcellen die EGFR tot expressie brengen. Doordat niet alle tumorcellen overexpressie van EGFR vertonen, is er een aanzienlijk risico dat er tumoraal weefsel overblijft wanneer tumorale cellen aan de rand van de tumor een lage expressie vertonen en deze expressie gebruikt wordt om de chirurgische marges te bepalen bij fluorescentie-geleide chirurgie.

In een onderzoek van Fraser et al. (2016) naar caniene gliomen werd er overexpressie van EGFR gezien bij ongeveer de helft van de gevallen. Hier waren er echter belangrijke verschillen tussen de verschillende fenotypes van de tumor. Zo brachten bij het glioomsubtype gliomatosis cerebri 100% van de tumorcellen EGFR tot overexpressie terwijl dit bij de andere glioomsubtypes varieerde van 33 tot 71%. Vooraleer EGFR als doelwit gebruikt kan worden bij deze tumoren, dient er dus verder onderzoek te gebeuren naar het verband tussen het aangetaste weefsel en de mate van overexpressie. Bij gliomen werd er in de studie van Fraser et al. (2016) ook gezien dat overexpressie hoger is bij hooggradige tumoren dan bij laaggradige tumoren. Het spreekt voor zich dat voor toepassingen van fluorescentie-geleide chirurgie ter hoogte van de hersenen ook rekening dient gehouden te worden met de bloedhersenbarrière (Pardridge, 2020), waardoor grote moleculen, zoals monoklonale anti-EGFR-antistoffen niet tot bij de tumor geraken. Verder is het gebruik van fluorescentie-geleide chirurgie tijdens resectie van caniene gliomen beperkt, gezien honden met gliomen niet in aanmerking komen voor chirurgie (Fraser et al., 2016).

Ook bij mammaire carcinomen is er slechts overexpressie bij 30% tot 55% van de tumoren (Carvalho et al., 2013; Silva et al. 2014), waardoor fluorescentie-geleide chirurgie weinig interessant blijkt (Figuur 5). Er is geen significant verschil tussen de carcinoomsubtypes, maar er is wel een correlatie aangetoond tussen de overexpressie van EGFR en de prognose. Een hogere expressie wordt geassocieerd met een slechtere prognose (Carvalho et al., 2013; Silva et al., 2014).

Gezien de gelijkenissen met humane melanomen werd de expressie van EGFR bij caniene maligne orale en cutane melanomen reeds uitvoerig bestudeerd. Omdat de overexpressie hier zeer beperkt is, lijkt EGFR een minder geschikt doelwit voor dit type tumoren (Veloso et al., 2020).



Figuur 4. Histopathologie en immunohistochemie van cycline D1-negatieve letsels aan de melkklier. A. Histopathologie van een papillaire proliferatie van epitheliale cellen bij een drie jaar oude hond (kruising). B. Zeldzame positieve reactie op immunohistochemie, dit wordt gezien als een negatieve reactie. C. Histopathologie van adenocarcinoma van de melkklier bij een vijf jaar oude Duitse herder. D. Immunohistochemie van weefsel c, negatieve reactie op immunohistochemie (Figuren uit: Sfactoria et al., 2003).

In de literatuur wordt de expressie van EGFR bij diverse andere caniene tumoren, zoals osteosarcomen, lymfomen, nasale tumoren en leukemie, beschreven, maar reeds uitgevoerde studies geven geen duidelijke resultaten over de eventuele bruikbaarheid voor fluorescentie-geleide chirurgie (Rutteman et al., 1994; Sabattini et al., 2014).

Ook bij EGFR kunnen dus een aantal tumoren geïdentificeerd worden. Verder onderzoek is echter aangewezen.

BESCHIKBAARHEID

Een tweede belangrijke factor bij de keuze van een geschikt doelwit voor fluorescentie-geleide chirurgie is de locatie of beschikbaarheid van het doelwit. Het doelwit moet vlot bereikbaar zijn voor de antilichamen die eraan moeten binden. Het ideale doelwit bevindt zich daarom op de celmembraan aangezien dit veel makkelijker bereikbaar is dan het intracellulaire milieu (Vahrmeijer en Hutteman, 2014; Tringale et al., 2018; Hernot et al., 2019; Londhe et al., 2019). EGFR is een transmembranair eiwit, het bevindt zich op de celmembraan, waardoor een merker er eenvoudig aan kan binden (Fraser et al., 2016). Cycline D1 daarentegen is een chromosomaal eiwit dat in tumorale cellen in grote mate accumuleert in het cytoplasma of de celkern. In inactieve toestand bevindt cycline D1 zich in het cytoplasma van een cel. Na activatie migreert cycline D1 naar de celkern en oefent daar zijn regulerende werking uit (Tchakarska en Sola, 2020). Deze variabele locatie maakt dat het een veel moeilijker te bereiken doelwit is. Enkel kleinere moleculen zijn namelijk in staat om het celmembraan te penetreren. Om die reden is het therapeutisch antilichaam tegen cycline D1 een klein antilichaam in plaats van een klassiek monoklonaal antilichaam (Wu et al., 2020). Er werd onderzoek verricht naar het ontwikkelen van kleinere antilichamen, ook in het kader van fluorescentie-geleide chirurgie (El-Sayed et al., 2018). Verdere studies worden gewijd aan de optimalisatie van de klaring en de biodistributie. Of het binden van een fluorescerende stof aan een klein antilichaam de passage doorheen het celmembraan beïnvloedt, kan uit de beschikbare literatuur niet meteen worden afgeleid.

CONCLUSIE

Voor cycline D1 is pas recent een antilichaam ontwikkeld, terwijl er reeds langer en intensiever onderzoek gebeurt naar EGFR, zelfs in het licht van fluorescentie-geleide chirurgie. Niet geheel onverwacht heeft het vergelijkend onderzoek naar cycline D1 en EGFR tot een duidelijke voorkeur voor EGFR geleid. Diepgaander onderzoek is ook bij honden echter aangewezen. EGFR scoort beter dan cycline D1 wat zowel tumorspecificiteit als locatie/beschikbaarheid

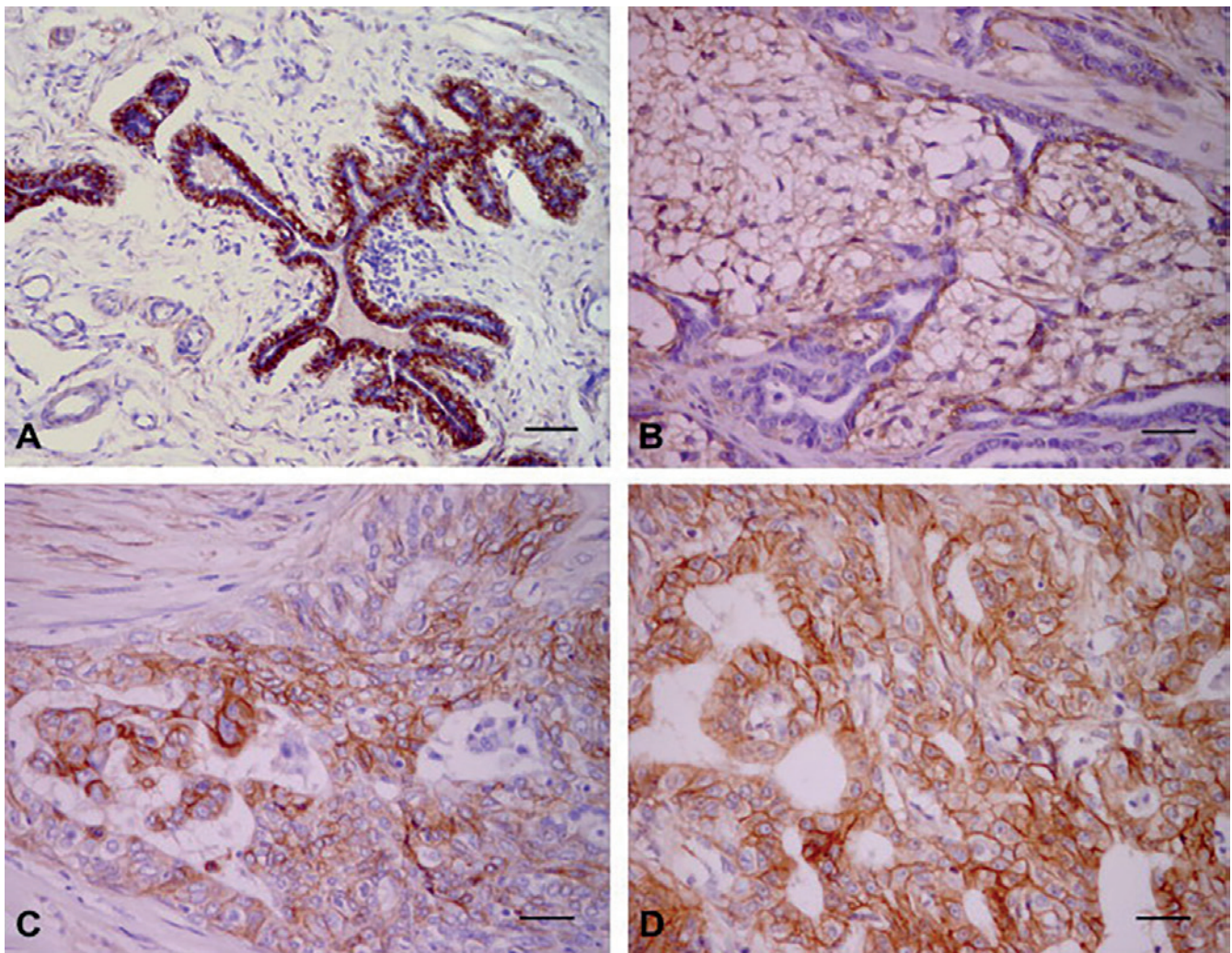
betreft. EGFR lijkt een makkelijk te bereiken doelwit dankzij zijn aanwezigheid op de celmembranen. Een fluorescent gemarkeerd antilichaam kan hierdoor zeer vlot op de receptor binden. Ook wat betreft tumorspecificiteit blijkt EGFR de betere keuze. Bij bepaalde tumorsoorten werden er zeer hoge niveaus van dit eiwit gedetecteerd terwijl de niveaus in gezonde weefsels zeer laag zijn. Liganden gebonden aan fluorescente moleculen binden hierdoor in veel grotere mate aan tumorale weefsel dan aan gezond weefsel. Bij gevolg kan er aangenomen worden dat de tumor zeer nauwkeurig (<1 mm) onderscheiden kan worden van het gezonde weefsel (Rosenthal et al., 2014; Hazono et al., 2015). Vooraleer EGFR in de praktijk als doelwit gebruikt kan worden voor fluorescentiegeleide chirurgie bij caniene tumoren is verder onderzoek noodzakelijk.

Bovendien is het belangrijk te duiden dat voor de

toepassing van fluorescentiegeleide chirurgie er niet één doelwitproteïne bestaat dat voor alle tumoren zou kunnen gebruikt worden. Er werden belangrijke verschillen gezien in expressiepatroon tussen verschillende soorten tumoren en zelfs binnen een tumorsoort is de expressie van cycline D1 en EGFR afhankelijk van de lokalisatie van de tumor. Er kan worden aangenomen dat dit ook voor de grote meerderheid van mogelijke alternatieve doelwitproteïnen het geval is. De heterogeniteit van tumoren zal dus steeds een uitdaging zijn voor fluorescentiegeleide chirurgie.

REFERENTIES

Araújo, M. R., Campos, L. C., Damasceno, K. A., Gamba, C. O., Ferreira, E., Cassali, G. D. (2016). HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of



Figuur 5. Immunohistochemie voor de analyse van “epidermal growth factor receptor” (EGFR)-expressie in melkklierweefsels bij de hond. A. In normaal melkklierweefsel is er EGFR expressie in de myoepitheliale cellen, maar niet in de epitheelcellen. B. De myoepitheliale cellen bij een complex adenoom hebben een matige EGFR-expressie terwijl de epitheelcellen geen expressie vertonen. C. Complex carcinoma waarbij de membraan van meer dan 10% van de epitheeliale tumorcellen zwak tot matig aankleuren met behulp van immunohistochemie. D. Tubulopapillair carcinoom waarbij de membraan van meer dan 10% van de epitheeliale tumorcellen sterk tot volledig aankleuren met behulp van immunohistochemie (Figuren uit: Gama et al., 2009).

- canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Research in Veterinary Science* 106, 121–130.
- Cangul, I. T., Wijnen, M., Van Garderen, E., Van Den Ingh, T.S. (2002). Clinico-pathological aspects of canine cutaneous and mucocutaneous plasmacytomas. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine* 49(6), 307–312.
- Carvalho, M. I., Guimarães, M. J., Pires, I., Prada, J., Silva-Carvalho, R., Lopes, C., Queiroga, F. L. (2013). EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 95(3), 1094–1099.
- Favril, S., Abma, E., Blasi, F., Stock, E., Devriendt, N., Vanderperren, K., de Rooster, H. (2018). Clinical use of organic near-infrared fluorescent contrast agents in image-guided oncologic procedures and its potential in veterinary oncology. *Veterinary Record* 183(11), 354.
- Fraser, A. R., Bacci, B., le Chevoir, M. A., Long, S. N. (2016). Epidermal growth factor receptor and Ki-67 expression in canine gliomas. *Veterinary Pathology* 53(6), 1131–1137.
- Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., Stratton, M. R. (2004). A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* 4(3), 177–183.
- Gama, A., Gärtner, F., Alves, A., Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* 87(3), 432–437.
- Gioux S, Choi HS, Frangioni JV. (2010). Image-guided surgery using invisible near-infrared light: Fundamentals of clinical translation. *Molecular Imaging* 9(5), 237–255.
- Hanazono, K., Fukumoto, S., Kawamura, Y., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H., Uchide, T. (2015). Epidermal growth factor receptor expression in canine transitional cell carcinoma. *Journal of Veterinary Medical Science* 77(1), 1–6.
- Hernot, S., van Manen, L., Debie, P., Mieog, J.S.D., Vahrmeijer, A.L. (2019). Latest developments in molecular tracers for fluorescence image-guided cancer surgery. *The Lancet Oncology* 20(7), e354–367.
- Holt, D., Okusanya, O., Judy, R., Venegas, O., Jiang, J., DeJesus, E., Eruslanov, E., Quatromoni, J., Bhojnarwala, P., Deshpande, C., (2014). Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation. *PLoS ONE* 9(7).
- Huang, S. F., Chien, H. T., Cheng, S. D., Chuang, W. Y., Liao, C. T., Wang, H. M. (2017). EGFR copy number alterations in primary tumors, metastatic lymph nodes, and recurrent and multiple primary tumors in oral cavity squamous cell carcinoma. *BioMed Central Cancer* 17(1), 1–9.
- Keereweer, S., Kerrebijn, J. D., van Driel, P. B., Xie, B., Kaijzel, E. L., Snoeks, T. J., Que, I., Hutteman, M., van der Vorst, J. R., Mieog, J. S., (2011). Optical image-guided surgery – Where do we stand? *Molecular Imaging and Biology* 13(2), 199–207.
- Kim, J. K., Diehl, J. A. (2009). Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *Journal of Cellular Physiology* 220(2), 292–296.
- Klopfleisch, R., von Euler, H., Sarli, G., Pinho, S. S., Gärtner, F., Gruber, A. D. (2011). Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: News from an old disease. *Veterinary Pathology* 48(1), 98–116.
- Lee E.S., Kim T.S., Kim S-K. Current status of optical imaging for evaluating lymph nodes and lymphatic system. *Korean Journal of Radiology* 2015(16), 21–31.
- London, P., Gutwillig, M., London, C. (2019). Targeted Therapies in Veterinary Oncology. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 49(5), 917–931.
- Low, P. S., Singhal, S., Srinivasarao, M. (2018). Fluorescence-guided surgery of cancer: applications, tools and perspectives. *Current Opinion in Chemical Biology* 45, 64–72.
- McKay, J. A., Murray, L. J., Curran, S., Ross, V.G., Clark, C., Murray, G. I., Cassidy, J. McLeod, H. L. (2002). Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *European Journal of Cancer* 38(17), 2258–2264.
- Mochida, A., Ogata, F., Nagaya, T., Choyke, P. L., Kobayashi, H. (2018). Activatable fluorescent probes in fluorescence-guided surgery: Practical considerations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26(4), 925–930.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K., Yamaguchi, R. (2000). Amplification of the cyclin gene in canine and feline mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 62(7), 783–787.
- Nagaya, T., Nakamura, Y. A., Choyke, P.L., Kobayashi, H. (2017). Fluorescence-guided surgery. *Frontiers in Oncology* 7 doi.
- Pardridge W. M. (2020). Blood-brain barrier and delivery of protein and gene therapeutics to brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 373.
- Predina, J. D., Runge, J., Newton, A., Mison, M., Xia, L., Corbett, C., Shin, M., Sulyok, L. F., Durham, A., Nie, S., Singhal, S., Holt, D. (2019). Evaluation of aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence yields disparate results in murine and spontaneous large animal models of lung cancer. *Scientific Reports* 9(1), 1–10.
- Rosenthal, E. L., Warram, J. M., Bland, K. I., Zinn, K. R. (2014). The status of contemporary image-guided modalities in oncologic surgery. *Bone* 23(1), 1–7.
- Rosenthal, E. L., Warram, J. M., de Boer, E., Chung, T. K., Korb, M. L., Brandwein-Gensler, M., Strong, T. V., Schmalbach, C. E., Morlandt, A. B., Agarwal, G., (2015). Safety and tumor specificity of cetuximab-IRDye800 for surgical navigation in head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* 21(16), 3658–3666.
- Rutteman, G. R., Foekens, J. A., Portengen, H., Vos, J.H., Blankenstein, M.A., Teske, E., Cornelisse, C.J., Misdorp, W. (1994). Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-affected and tumorous mammary tissue of female dogs. *Breast Cancer Research and Treatment* 30(2), 139–146.
- Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M.R., Cooper, C.S. (2010). A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* 10(1), 59–64.
- Sabattini, S., Mancini, F. R., Marconato, L., Bacci, B., Rossi, F., Vignoli, M., Bettini, G. (2014). EGFR overexpression in canine primary lung cancer: Pathogenetic implications and impact on survival. *Veterinary and Comparative Oncology* 12(3), 237–248.
- Schaafsma, B. E., Mieog, J. S., Hutteman, M., van der Vorst, J. R., Kuppen, P. J., Löwik, C. W., Frangioni, J. V., van de Velde, C. J., Vahrmeijer, A. L. (2011). The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *Journal of Surgical Oncology* 104(3), 323–332.

- Sfacteria, A., Bertani, C., Costantino, G., Del Blue, M., Paiardini, M., Cervasi, B., Piedimonte, A., De Vico, G. (2003). Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 128(4), 245–251.
- Silva, I.L.D., Dias, A.P.M., Bertagnolli, A.C., Cassali, G.D., Ferreira, E. (2014). Analysis of EGFR and HER-2 expressions in ductal carcinomas in situ in canine mammary glands. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 66(3), 763–768.
- Simpson, R. M., Bastian, B. C., Michael, H. T., Webster, J. D., Prasad, M. L., Conway, C. M., Prieto, V. M., Gary, J. M., Goldschmidt, M. H., Esplin, D. G., Smedley, R. C., et al. (2014). Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research* 27(1), 37–47.
- Singer, J., Fazekas, J., Wang, W., Weichselbaumer, M., Matz, M., Mader, A., Steinfeldner, W., Meitz, S., Mechtcheriakova, D., Sobanov, Y., (2014). Generation of a canine anti-EGFR (ErbB-1) antibody for passive immunotherapy in dog cancer patients. *Molecular Cancer Therapeutics* 13(7), 1777–1790.
- Tchakarska, G., Sola, B. (2020). The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle* 19(2), 163–178.
- Tringale, K. R., Pang, J., Nguyen, Q. T. (2018). Image-guided surgery in cancer: A strategy to reduce incidence of positive surgical margins. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 10(3), 1–18.
- Vahrmeijer, A. L., Hutteman, M., van der Vorst, J. R., van de Velde, C. J., Frangioni, J. V. (2014). Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nature Reviews Clinical Oncology* 10(9), 507–518.
- van Manen, L., Handgraaf, H., Diana, M., Dijkstra, J., Ishizawa, T., Vahrmeijer, A. L., Mieog, J. (2018). A practical guide for the use of indocyanine green and methylene blue in fluorescence-guided abdominal surgery. *Journal of Surgical Oncology* 118(2), 283–300.
- Veloso, E.S., Gonçalves, I.N.N., Silveira, T.L., Oliveira, F.S., Vieira, D.S., Cassali, G.D., Del Puerto, H.L., Ferreira, E. (2020). Diverse roles of epidermal growth factors receptors in oral and cutaneous canine melanomas. *BioMed Central Veterinary Research* 16(1), 1–11.
- Visgauss, J. D., Eward, W. C., Brigman, B. E. (2016). Innovations in Intraoperative Tumor Visualization. *Orthopedic Clinics of North America* 47(1), 253–264.
- Wu, Y., Tang, W., Cao, Y., Jiang, D., Zhao, L., Zhao, J., Zhang, Y., Li, C., Cheng, C., Wang, S., Yang, F., Zhu, X., Li, G. (2020). A Cyclin D1-specific single-chain variable fragment antibody that inhibits hepG2 cell growth and proliferation. *Biotechnology Journal*, 15(8), e1900430.
- Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Kodama, A., Mori, T., Yanai, T., Maruo, K., Masegi, T. (2007). The significance of p53 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Medical Science* 69(3), 271–278.
- Zamboni, C., Brocca, G., Ferrareso, S., Ferro, S., Sammarco, A., Dal Corso, C., Lussich, S., de Andres, P.J., de Merlo, E.M.M., Cavicchioli, L., (2020). Cyclin D1 immunohistochemical expression and somatic mutations in canine oral melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 18(2), 231–238.



© 2022 by the authors. Licensee Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, Ghent University, Belgium. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of

the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).